



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA  Facultat de Ciències Biològiques

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa Oficial de Doctorado en Biología y Biotecnología regulado por el RD
99/2011

UTILIDAD DE PLA2G2A, CD84 Y UBIQUITINA EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS MUESTRAS DE SEMEN Y EN LA SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES

Memoria realizada por D^a Nerea Sota Echarri

para optar al Grado de Doctor por la Universitat de València

Dirigida por:

Dr. D. Nicolás Garrido Puchalt

Dr. D. Marcos Meseguer Escrivá

Valencia, Julio 2018

Dr. D. Nicolás Garrido Puchalt, Doctor en Biología por la Universidad de Valencia

INFORMA:

Que D^a Nerea Sota Echarri ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: "Utilidad de PLA2G2A, CD84 y Ubiquitina en el diagnóstico de las muestras de semen y en la selección de espermatozoides".

Dicha memoria está concluida y se considera apta para su lectura y defensa públicas.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación.

Valencia, 4 de junio de 2018



FDO. Dr. D. Nicolás Garrido Puchalt

RATIFICA el tutor Dr. D. Carles Soler Vázquez



FDO. Dr. D. Carles Soler Vázquez

Dr. D. Marcos Meseguer Escrivá, Doctor en Biología por la Universidad de Valencia

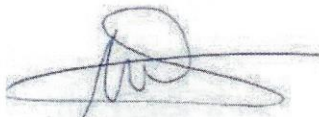
INFORMA:

Que D^a Nerea Sota Echarri ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: "Utilidad de PLA2G2A, CD84 y Ubiquitina en el diagnóstico de las muestras de semen y en la selección de espermatozoides".

Dicha memoria está concluida y se considera apta para su lectura y defensa públicas.

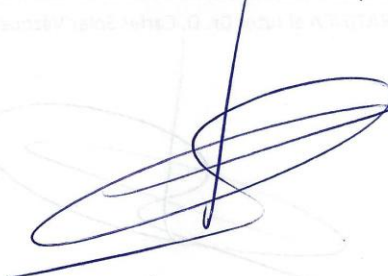
Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación.

Valencia, 4 de junio de 2018



FDO. Dr. D. Marcos Meseguer Escrivá

RATIFICA el tutor Dr. D. Carles Soler Vázquez



FDO. Dr. D. Carles Soler Vázquez

Agradecimientos

Y ha llegado el momento por fin de afrontar los agradecimientos e intentaré ser breve pero intensa, fiel a mi estilo😊.

Primero de todo, quería agradecer a mis directores de tesis, Nicolás y Marcos, el apoyo y el cariño recibido durante todo este largo camino, por confiar en mí, por no solo permitir, sino ser promotores de mi regreso “a casa”, por ser más que directores de tesis, pero sobre todo, por no dejarme abandonar este proyecto.

Gracias a los chicos de la Fundación, en especial a Alicia y Sebas y a los de citómica del Príncipe Felipe, Ali y Dom, por vuestra ayuda, amabilidad y disponibilidad siempre. Gracias también a Alfredo, por todo tu trabajo en esta tesis y toda la paciencia que te he obligado a desarrollar ¡muchísimas gracias de corazón!

Un millón de gracias también a las chicas del laboratorio de Andrología (las Alis, Paloma, Yolanda, Carol e Isa) por el apoyo y comprensión, por las risas, las lágrimas y todo lo que en ese laboratorio de IVI3 hemos compartido. Y a Rocío, desde luego sin tu presencia a mi lado en el lab hoy no estaría escribiendo esto, gracias por acogerme desde ese primer mail sin conocernos, por convertirte en una gran amiga y ser tan generosa conmigo, GRACIAS por tanto Ro.

Gracias también al resto de mis amigas; a las que me acompañaron en Valencia, en especial a las “Chicas que molan” (Yolanda, Mar, Lucía, Clara y Aila) que me hicieron sentir como en casa siempre. A Alba, la que me soporta hoy en día (todos los días), gracias por permitir mis ausencias para terminar esta tesis y por tantos buenos momentos en nuestro pequeño “zulo”.

Y miles de gracias a las amigas de siempre, a las más incondicionales de todas, gracias por aguantarme y acompañarme sobre todo en esta última época, por

vuestro apoyo silencioso (al que os tengo obligados a todos) que no he dejado de sentir nunca.

Por último gracias a mis padres por tanto (TODO) que me han dado siempre, por estar siempre ahí durante todo este camino, por aguantar mis lágrimas, mis enfados, las malas caras, los momentos de bajón, los de subidón, por estar siempre conmigo en esta montaña rusa. ¡PERDONADME Y GRACIAS!

Gracias a ti, porque volviste a mi vida, a la vez que la aventura de esta tesis comenzaba y juntos hemos conseguido terminar con ella. Ahora otra nueva aventura se abre ante nosotros y volveremos a vencer. ¡Te quiero!

Sin toda esta gente esta tesis no hubiera sido posible, así que es tan vuestra como mía. ¡MILLONES DE GRACIAS A TODOS!

Nerea

Resumen

La infertilidad afecta hoy en día al 15% de las parejas en edad fértil. Su origen es difícil de determinar, no obstante, se estima que en un 50% de los casos es debido a un factor masculino. Sin embargo, en la actualidad, los medios de los que se dispone en la clínica para evaluar el potencial fértil de un varón se limitan a una valoración cuantitativa y morfológica, en cierta medida subjetiva, de los espermatozoides (spz). Del mismo modo, la selección de spz para los tratamientos, tampoco está basada en características moleculares.

Con tal de mejorar estos aspectos, se están buscando marcadores moleculares en el spz que puedan ser utilizados como diagnóstico y a la vez como herramienta para la selección espermática pre-tratamiento. En esta línea, el presente proyecto tiene como objetivo evaluar el potencial uso de 3 moléculas como biomarcadores diagnósticos o pronósticos de las TRA y su posible aplicación en el enriquecimiento de una población espermática en células con las moléculas de interés, utilizando la técnica de MACS.

Las tres moléculas candidatas -PLA2G2A, CD84, UBP- han sido seleccionadas a partir de información obtenida en estudios previos del grupo y de la bibliografía disponible, por su relación con los resultados reproductivos, localización en el spz (membrana) y función.

Con tal de evaluar el potencial uso de las candidatas como marcadores de calidad espermática se ha evaluado la relación entre su presencia (mediante citometría de flujo), en muestras capacitadas de spz utilizadas para TRA, con: los parámetros básicos del semen, la calidad de los embriones generados tras los tratamientos de ICSI y el éxito reproductivo de los tratamientos.

De estos análisis se concluye con respecto al CD84 que no es un buen candidato a ser marcador de calidad seminal por su limitada presencia en las muestras espermáticas y la ausencia de correlaciones biológicamente importantes con los parámetros analizados. Con respecto a PLA2G2A, se han encontrado relaciones inversas entre su presencia y los parámetros de calidad seminal post capacitación, también se han descrito asociaciones directas entre algunas variables de buen desarrollo embrionario y la presencia de la molécula en spz, siendo estas relaciones muy poco robustas. En el caso de la UBQ se ha verificado que existe asociación entre su presencia en los spz y los parámetros básicos de calidad seminal y además por las asociaciones encontradas con la calidad embrionaria parece un buen candidato a predictor de buena calidad embrionaria en tratamientos con ovocitos propios.

Índice

INTRODUCCIÓN	1
1. LA INFERTILIDAD.....	3
1.1 <i>La infertilidad masculina</i>	5
2. EL ESPERMATOZOIDE	8
2.1 <i>Estructura</i>	8
2.2 <i>Proceso de formación</i>	9
3. EL ESPERMATOZOIDE, ALGO MÁS QUE UN VECTOR DE ADN	11
3.1 <i>Necesario para la activación ovocitaria.</i>	11
3.2 <i>Aporta el centriolo activo.</i>	13
3.3 <i>Introduce ARN con diferentes funciones.</i>	14
4. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE LA INFERTILIDAD MASCULINA.....	19
4.1 <i>El espermograma</i>	19
4.2 <i>Nuevos métodos diagnósticos</i>	22
5. MÉTODOS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA	38
5.1 <i>Selección de espermatozoides con receptores de ácido hialurónico.</i>	38
5.2 <i>Selección morfológica de espermatozoides</i>	39
5.3 <i>Selección de espermatozoides no apoptóticos.</i>	40
5.4 <i>Selección de espermatozoides por carga eléctrica</i>	44
5.5 <i>Selección de espermatozoides birrefringentes</i>	46
5.6 <i>Selección mediante microespectroscopía Raman</i>	47
6. TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA.	49
6.1 <i>Inseminación Artificial (IA)</i>	49
6.2 <i>FIV convencional</i>	51
6.3 <i>Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)</i>	52
6.4 <i>Donación de gametos</i>	54
6.5 <i>Evaluación de embriones</i>	55
OBJETIVOS	61
MATERIAL Y MÉTODOS.....	65
1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	67
1.1 <i>Objetivo 1</i>	67
1.2 <i>Objetivo 2</i>	70

2.	OBJETIVO 1: EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE LAS MOLÉCULAS ESTUDIADAS EN LA MEMBRANA ESPERMÁTICA.....	71
2.1	<i>Tratamientos de IAH.....</i>	71
2.2	<i>Tratamientos de FIV mediante ICSI.....</i>	75
2.3	<i>Trasferencia de embriones congelados.....</i>	82
2.4	<i>Citometría de Flujo.....</i>	83
2.5	<i>Variables en estudio.....</i>	88
2.6	<i>Análisis estadísticos.....</i>	91
3.	OBJETIVO 2: EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA SEPARACIÓN DE ESPERMATOZOIDES MEDIANTE MACS, EN FUNCIÓN DE UBQ Y PLA2G2A.	93
3.1	<i>Reclutamiento de pacientes y procesamiento de las muestras.....</i>	93
3.2	<i>Aplicación del protocolo de MACS.....</i>	93
3.3	<i>RT-PCR.....</i>	95
3.4	<i>Reacción en cadena de la polimerasa.....</i>	99
3.5	<i>Comparación de la expresión génica entre fracciones.....</i>	100
3.6	<i>Análisis estadístico.....</i>	102
	RESULTADOS.....	103
1.	DESCRIPCIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE CD84, PLA2G2A Y UBQ.....	105
2.	OBJETIVO 1.1. RELACIÓN DE CD84, PLA2G2A Y UBQ CON LOS PARÁMETROS SEMINALES. .	108
2.1	<i>Datos descriptivos de las características seminales.....</i>	108
2.2	<i>Análisis de características seminales en relación con CD84, PLA2G2A y UBQ.</i>	109
3.	OBJETIVO 1.2. RELACIÓN DE CD84, PLA2G2A Y UBQ CON LOS PARÁMETROS EMBRIONARIOS.	118
3.1	<i>Embriones viables.....</i>	118
3.2	<i>Número de células en día 3 de desarrollo.....</i>	122
3.3	<i>Porcentaje de fragmentación en día 3 de desarrollo.....</i>	124
3.4	<i>Simetría en día 3 de desarrollo.....</i>	128
3.5	<i>Estadio en día 5 de desarrollo.....</i>	131
3.6	<i>Estadio en día 6 de desarrollo.....</i>	134
4.	OBJETIVO 1.3. RELACIÓN DE CD84, PLA2G2A Y UBQ CON LOS RESULTADOS DE LA TRA....	137
4.1	<i>Datos epidemiológicos de las pacientes.....</i>	137
4.2	<i>Inseminación artificial.....</i>	138
4.3	<i>FIV con ovocitos propios.....</i>	141
4.4	<i>FIV con ovocitos donados.....</i>	149

5. OBJETIVO 2: SEPARACIÓN DE LAS MUESTRAS EN FUNCIÓN DE LA PRESENCIA DE LAS MOLÉCULAS.	156
--	-----

DISCUSIÓN 159

1. OBJETIVO 1. EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE LAS MOLÉCULAS ESTUDIADAS EN LA MEMBRANA ESPERMÁTICA.....	162
1.1 <i>Relacionar las tres moléculas estudiadas en los espermatozoides con los parámetros seminales.</i>	162
1.2 <i>Relacionar las tres moléculas estudiadas en los espermatozoides con los resultados de la calidad de los embriones generados tras ICSI.</i>	171
1.3 <i>Relacionar las tres moléculas estudiadas en los espermatozoides con los resultados de los tratamientos de reproducción asistida</i>	178
2. OBJETIVO 2. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA SEPARACIÓN DE ESPERMATOZOIDES MEDIANTE MACS, EN FUNCIÓN DE UBQ Y PLA2G2A	182

CONCLUSIONES..... 187

BIBLIOGRAFÍA 191

Introducción

1. La infertilidad

La Sociedad Americana de Medicina de la Reproducción (ASRM) define la infertilidad como una enfermedad que se caracteriza por la incapacidad para conseguir embarazo de manera natural después de más de 12 meses de relaciones sexuales sin protección o inseminaciones con semen de donante (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2013b).

A pesar de que se manejan cifras globales mundiales de afección de esta enfermedad (entre el 15-20% de la población), el estudio epidemiológico de la infertilidad tiene algunas características que lo hacen particularmente complejo.

La principal dificultad que plantea el estudio de la infertilidad es que la única manera de medirla (el resultado único) es el nacimiento de un bebé sano, sin embargo son dos los factores que deben estudiarse: el factor femenino y el masculino, por su contribución independiente a la enfermedad (Winters and Walsh 2014).

Por otro lado, la mayoría de estudios disponibles en cuanto a la prevalencia de la infertilidad no son comparables entre sí, puesto que presentan definiciones de infertilidad diferentes, así como métodos de cálculo distintos (Mascarenhas et al. 2012).

Por último, también es interesante señalar el alto componente social y la naturaleza “íntima” que tiene esta enfermedad que puede hacer desviar las estadísticas y los estudios, sobre todo en determinados países (Agarwal et al. 2015).

A pesar de estas dificultades y teniéndolas en cuenta, se señalarán algunos de los datos más actualizados de los que disponemos, para dar una visión general de la magnitud y la importancia del estudio de la infertilidad.

La Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) en Octubre de 2016 publica que una de cada 6 parejas en el mundo experimentará a lo largo de su vida fértil alguno de los tipos de infertilidad que existen y señala que la prevalencia de la infertilidad es del 9% en mujeres de entre 20 y 44 años (ESHRE 2017)

Un artículo de Mascarenhas y colaboradores, que analiza los datos de 277 encuestas de todo el mundo, estima que el número de parejas afectadas por esta enfermedad era en 2010 de 48,5 millones. Siendo las regiones con mayor prevalencia: Sur de Asia, África subsahariana, Norte de África/Oriente medio, Europa central y del este y centro de Asia (Mascarenhas et al. 2012).

Además de la infertilidad existe otro término con significado similar; la **esterilidad**, que hoy en día se utilizan indistintamente, aunque esterilidad se ha quedado como un término relativamente anticuado. En su origen ambos términos tenían significados sutilmente diferentes, siendo la esterilidad la incapacidad para concebir y la infertilidad la incapacidad de una pareja para gestar y dar lugar a un recién nacido. Por lo tanto, la infertilidad engloba o incluye la esterilidad (Nieschlag 2010). En este trabajo se usarán ambas palabras como sinónimos.

La determinación de la causa de la infertilidad de una pareja resulta bastante complicada, debido a los múltiples factores que intervienen, que a su vez provienen de dos entes individuales, como ya hemos apuntado previamente.

Aunque tradicionalmente el estudio del origen de la infertilidad de una pareja se ha focalizado en las mujeres, hoy en día se dispone de estudios que demuestran la práctica igualdad entre ambos factores como posible origen de la infertilidad de una pareja y así lo recoge la ESHRE(ESHRE 2017):

- 20-30% de los casos se explican por causas fisiológicas en el hombre
- 20-35% por causas fisiológicas en la mujer
- 25-40% la causa es mixta (ambos tienen alguna afección)
- 10-20% no se conoce la causa de la infertilidad

1.1 La infertilidad masculina

Como se aprecia en los datos aportados por la ESHRE, trastornos del factor masculino están presentes en aproximadamente el 50% de los casos de infertilidad, ya sea el único causante o en combinación con alteraciones también en el factor femenino (Agarwal et al. 2015, ESHRE 2017).

Se estima que alrededor de 7 de cada 100 hombres en el mundo se enfrentan a alteraciones de su fertilidad en algún momento de su vida. Lo que supone superar en prevalencia a enfermedades como la diabetes *mellitus* que es considerada casi endémica (Nieschlag 2010).

De acuerdo a una reciente revisión de Agarwal y colaboradores (Agarwal et al. 2015) en el mundo existen al menos 30 millones de hombres con infertilidad, encontrándose las mayores tasas en África y en el este de Europa.

La infertilidad masculina puede ser el resultado de diversas alteraciones a distintos niveles: anomalías en el control hormonal, desórdenes en la espermatogénesis, interrupción del transporte de espermatozoides, mutaciones, fallo en la interacción entre espermatozoide y ovocito o trastornos del coito (de Kretser et al. 2007). Se muestra una visión global de algunas posibles causas en la Tabla 1.

Causas de Infertilidad Masculina		
Hormonales	Lesiones hipotalámicas	Síndrome de Kallman/ Inducidas por opiáceos
	Lesiones de la pituitaria	Tumores/ Hemocromatosis/ Supresión de la LH y FSH por abuso de andrógenos u opiáceos
	Nivel testicular	Defectos en la síntesis de andrógenos/ Mutaciones en receptores de andrógenos
Testiculares	Anorquia, torsión	
	Criptorquidia	
	Orquitis	
	Irradiación, quimioterapia	
	Drogas	
	Exposición al calor	
	Varicocele	
	Inmunológicas	
	Genéticas	Síndrome de Klinefelter/ Delecciones en el cromosoma Y/ Disquinesia ciliar primaria
	Metabólicas	Fallo renal/ Fallo hepático
	Tumores testiculares	
	Defectos idiopáticos en la espermatogénesis	
Post-testiculares	Obstructivas	Ausencia congénita de vasos deferentes / Enfermedad de transmisión sexual/ Cirugía post-inguinal/ Vasectomía/ Intra-prostática
	Defecto madurativo del epidídimo	
	Infección de la glándula accesoria	
	Anticuerpos anti-espermatozoides	
	Trastornos coitales	Relaciones sexuales poco frecuentes / Disfunción eréctil/ Alteraciones eyaculatorias
	Alteración a nivel de la interacción espermatozoide-ovocito	

Tabla 1 Causas de infertilidad masculina. Modificado de de Krester (de Kretser et al. 2007)

A diferencia de las mujeres, los hombres no presentan una marcada disminución de la fertilidad a partir de determinada edad, en el caso de los hombres es un proceso más progresivo y que ocurre a una edad más avanzada.

Sin embargo, se ha establecido de manera bastante consensuada por parte de los investigadores, que la edad paterna avanzada se asocia con cambios en la producción de hormonas sexuales (encontrando niveles elevados de FSH-hormona folículo estimulante- y disminuidos de testosterona), con una disminución del volumen del eyaculado, la motilidad y la morfología de los espermatozoides (provocados por diferentes causas propias de la edad avanzada), con una disminución de la fertilidad (incluso tras técnicas de reproducción asistida) y con un aumento de enfermedades en la descendencia (probablemente fruto del aumento en las mutaciones *de novo* en los espermatozoides)(Belloc et al. 2014).

2. El espermatozoide

La reproducción humana requiere de la unión de dos células sexuales, cada una de las cuales aporte la mitad del material genético necesario para la formación de un embrión capaz de desarrollarse hasta un individuo completamente formado (Gartner and Hiatt 2002, Welsch and Deller 2014).

Estas células sexuales, ovocito en el caso femenino y espermatozoide en el caso masculino, son diferentes en muchos aspectos. El ovocito es la célula más grande del cuerpo humano con un diámetro aproximado de $150\mu\text{m}$, es el responsable de llevar la mayor parte de la maquinaria molecular necesaria para el desarrollo embrionario, además del sustento del mismo (Welsch and Deller 2014).

Al otro lado, el espermatozoide, cuyo pequeño tamaño ha hecho que tradicionalmente su función haya sido infravalorada, aunque cada vez más estudios están demostrando que sus funciones van más allá de la de ser únicamente transportador del ADN paterno.

2.1 Estructura

El espermatozoide es una célula alargada de aproximadamente $65\mu\text{m}$ de longitud, compuesta por (Figura 1) (Gartner and Hiatt 2002, Welsch and Deller 2014):

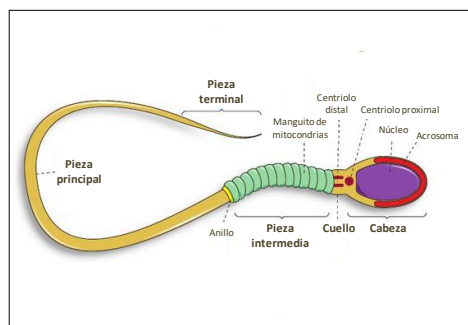


Figura 1 Morfología de espermatozoide humano. Modificado de Welsch(Welsch and Deller 2014).

La **cabeza** tiene forma oval, su eje mayor mide unos $5\mu\text{m}$. En ella se encuentra el núcleo que lleva el material genético altamente condensado y el acrosoma, vesícula que ocupa el 40-70% de la cabeza. El acrosoma contiene varias enzimas hidrolíticas responsables de abrir paso al espermatozoide a través de las cubiertas del ovocito para que alcance a este y lo fecunde.

El **cuello** es la pieza de conexión entre la cabeza y la cola del espermatozoide, también mide unos $5\mu\text{m}$ de longitud, contiene el centriolo proximal y el distal transformado en cuerpo basal del axonema.

La **pieza media** es delgada, regular y de aproximadamente la misma longitud que la cabeza. Su característica principal es la presencia de la vaina mitocondrial, que rodea al axonema central.

La **pieza principal**, con una longitud casi 10 veces la de la cabeza ($45\mu\text{m}$). El axonema de la pieza principal es la prolongación del de la pieza intermedia, alrededor del cual se encuentran 7 fibras densas externas, rodeadas de la vaina fibrosa. Hacia el final de la pieza principal terminan tanto las fibras densas externas como la vaina fibrosa.

La **pieza terminal** está compuesta únicamente por el axonema y en la última micra de la cola este se encuentra desorganizado en 20 microtúbulos individuales dispuestos al azar.

2.2 Proceso de formación

Durante la vida fetal las células germinales ocupan los túbulos seminíferos de los testículos proveyéndolos de células diploides indiferenciadas, conocidas como espermatogonias. Estas son el stock de células progenitoras de espermatozoides que comenzaran a dividirse en la pubertad del individuo.

El proceso de producción de espermatozoides se conoce como **espermatogénesis**, tiene lugar en los túbulos seminíferos, concretamente en el epitelio que forma la pared de dichos túbulos, conocido como: epitelio germinativo. Este proceso dura aproximadamente 75 días y se divide en tres periodos:

Periodo proliferativo o de mitosis. Las espermatogonias se dividen por mitosis dando lugar a células idénticas a las células madre (espermatogonias) y a células más diferenciadas, los espermatocitos tipo I.

Periodo de maduración o de meiosis. Cada uno de los espermatocitos tipo I por división meiótica (división reduccional) da lugar a 4 espermátides.

Espermiogénesis. Este periodo consiste únicamente en la transformación morfológica de una célula ya haploide (la espermátide) con una morfología celular normal, en una célula altamente especializada, con un citoplasma reducido (el espermatozoide). Por lo tanto, en esta fase no tienen lugar divisiones celulares.

El espermatozoide es liberado a la luz de túbulo seminífero (espermiación), gracias a las células de Sertoli (O'Donnell 2015). En este momento es una célula inmóvil e incapaz de fecundar un ovocito. Adquirirá movilidad a lo largo del tracto masculino y la capacidad fecundante en el del tracto genital femenino. Este proceso se conoce como **maduración post-testicular** (Whitfield et al. 2015, Yoshida et al. 2008).

Tanto la estructura como el proceso de formación de los espermatozoides se encuentra ampliamente detallado en numerosos libros de histología como los utilizados como fuente de información del presente trabajo (Gartner and Hiatt 2002, Welsch and Deller 2014).

3. El espermatozoide, algo más que un vector de ADN

Tradicionalmente se ha visto al espermatozoide únicamente como portador de la mitad del material genético necesario para la formación de un embrión y su desarrollo, pero nada más allá.

Sin embargo, hoy en día, aunque sigue siendo el ovocito el protagonista principal de la fecundación y del desarrollo embrionario, se le atribuyen al espermatozoide algunos papeles de importancia en estos eventos, que pasaremos a detallar a lo largo de este apartado.

En primer lugar es importante señalar que el espermatozoide en las condiciones naturales, ha de ser una célula capaz de reconocer y unirse a la zona pelúcida de un ovocito, atravesarla y unirse a su membrana, fusionarse con ella y entonces sí, introducir en el interior del ovocito el material genético del que es portador, así como otras moléculas importantes para diversos eventos (Rosales et al. 2006). Sin embargo en este apartado nos centraremos en las funciones que el espermatozoide tiene una vez ha entrado en el ovocito.

3.1 Necesario para la activación ovocitaria.

La activación del ovocito incluye una serie de eventos esenciales para que se inicie la formación del embrión de manera correcta, como son: exocitosis de gránulos corticales (prevención de la polispermia), extrusión del segundo corpúsculo polar, reorganización del citoesqueleto, reanudación de la meiosis, formación de pronúcleos, iniciación de la primera división mitótica, reclutamiento de los ARN mensajeros (ARNm) maternos y regulación de la expresión genética(Yeste et al. 2016).

Esta serie de eventos se ha visto que se inician con elevaciones del calcio intracelular. Tradicionalmente han sido varias las hipótesis que intentaban explicar

la aparición de estas oscilaciones de calcio en el ovocito (Yeste et al. 2016). Sin embargo, la mayoría de las evidencias demuestran que la más plausible es la teoría del factor espermático.

Esta teoría defiende que alguna sustancia presente en el espermatozoide inicia la liberación de calcio de los reservorios del ovocito en los que se encuentra almacenado (Fissore et al. 1999, Parrington et al. 2000, Swann et al. 2004). De entre varias moléculas propuestas como responsables de estos eventos, la que más argumentos acumula en su favor es la PLC ζ (1-fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato fosfodiesterasa zeta-1) (Cox et al. 2002, Kouchi et al. 2004, Saunders et al. 2002).

La localización celular de esta molécula (Escoffier et al. 2015, Fujimoto et al. 2004, Young et al. 2009), así como otros experimentos en los que se consigue la activación ovocitaria tras microinyección de PLC ζ recombinante o del ARN complementario que codifica para esta molécula (Swann et al. 2004, Yoon et al. 2012), apoyan la hipótesis de que PLC ζ sea el factor activador de ovocitos.

El mecanismo propuesto por el cual la PLC ζ provocaría las oscilaciones de calcio en el ovocito es la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), presente en las membranas de vesículas ovocitarias, en inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ se une a su receptor en la membrana del retículo endoplasmático causando la liberación de calcio de este orgánulo que es su reservorio natural (Yeste et al. 2016)(Figura 2).

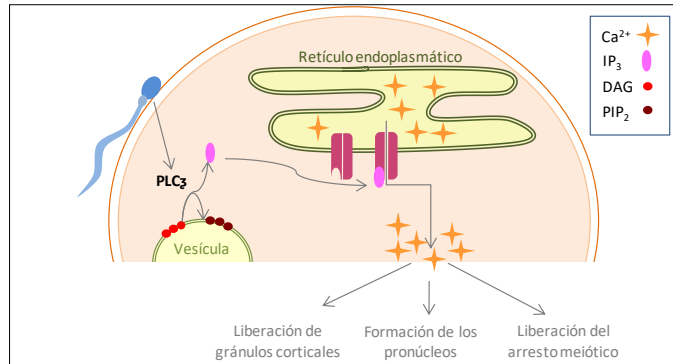


Figura 2 Esquema de ruta de actuación de la PLC ζ .

Sin embargo, existen otras proteínas que se han propuesto como candidatas: citrato sintasa (Harada et al. 2007), la forma truncada del receptor de c-kit tirosin kinasa (tr-kit)(Sette et al. 1997) o la proteína de unión al dominio WWP post-acrosomal (PAWP). Siendo esta última, la que más argumentos a su favor acumula para sustituir o complementar como factor espermático de activación ovocitaria a la PLC ζ (Aarabi et al. 2015, Wu et al. 2007).

Son necesarios, por lo tanto, más estudios para determinar cuál o cuáles son los factores espermáticos capaces de activar al ovocito y cuál es su ruta de activación.

3.2 Aporta el centriolo activo.

Ya a principios del siglo XX, Theodore Boveri propuso la teoría de la herencia paterna del centrosoma. Desde entonces han sido muchos otros los que han confirmado esta teoría en la mayoría de los animales, incluyendo los seres humanos (revisado en (Sathananthan 1998)) y excluyendo, sorprendentemente, a los ratones, cuya herencia centrosomal es materna (Schatten et al. 1986).

El centrosoma es un orgánulo que se presenta de manera unitaria en todas las células somáticas. Se compone de dos centriolos con forma de cilindro dispuestos

perpendicularmente el uno con respecto al otro y una matriz de proteínas conocida como material pericentriolar (PCM) (Sun and Schatten 2007).

Durante la gametogénesis se produce una reducción complementaria del centrosoma, es decir, en los ovocitos se pierden los centriolos pero se mantienen las proteínas del PCM y en los espermatozoides lo único que se conservan son los centriolos (Sun and Schatten 2007). Este hecho resulta fundamental para una correcta segregación de los cromosomas y por lo tanto un desarrollo normal de los embriones (Kai et al. 2015, Sathananthan et al. 1991, 1996).

En los espermatozoides humanos uno de los dos centriolos (distal) está parcialmente degenerado, a partir de él crece el axonema; el otro centriolo (proximal) es el responsable de ejecutar su función en el ovocito (Sathananthan et al. 1996, Sun and Schatten 2007). Este centriolo, localizado próximo al material genético paterno, forma microtúbulos que a partir de un pequeño áster espermático se van alargando y son responsables de la migración y unión de los pronúcleos durante la fase pronuclear, que termina en la fusión de ambos o singamia, necesaria para un correcto desarrollo embrionario (Hewitson et al. 2002).

3.3 Introduce ARN con diferentes funciones.

El espermatozoide no es solo portador del ADN también tiene otras implicaciones en la genética y epigenética del embrión.

Durante la espermiogénesis, la cromatina se condensa ocupando el mínimo espacio, además, gran parte del citoplasma celular junto con muchos de sus componentes es eliminado. En este momento, nos encontramos con una célula transcripcionalmente inactiva (Grunewald et al. 2005).

La inexistencia de ARN ribosómico en los espermatozoides y la ausencia de actividad transcripcional en estas células han llevado a pensar que la presencia de

ARN no era coherente. Sin embargo, con el desarrollo de técnicas de detección de ácidos nucleicos mucho más sensibles y la correcta aplicación de métodos de purificación de muestras seminales en espermatozoides, se ha llegado a demostrar fehacientemente la presencia de ARN en los espermatozoides humanos (Dadoune et al. 2005, Jodar et al. 2013, Miller and Ostermeier 2006).

Los datos que se manejan de cantidad de ARN en los espermatozoides son diferentes según los estudios; 50fg (Goodrich et al. 2007), 0,1pg (Pessot et al. 1989), 10-400fg (Hamatani 2012). En cualquier caso, estamos hablando de una cantidad de ARN unas 200 veces inferior que la cantidad de ARN presente en cualquier otro tipo celular (Jodar et al. 2013).

Se han descrito diferentes tipos de ARN en las células espermáticas y mucho se ha discutido y se sigue debatiendo, tanto sobre su origen, como sobre su posible papel en la fecundación y desarrollo embrionario. Los principales grupos detectados son:

ARN codificantes. Se han descrito diferentes orígenes y funciones posibles para estos ARNm; en primer lugar, pueden ser ARNm remanentes cuya función tiene lugar durante la espermiogénesis y permanecen en el espermatozoide como meros residuos, no teniendo papel alguno en el cigoto, ni en el embrión. Ejemplo de ese grupo es la protamina-2, gen que se encuentra altamente expresado en el momento de la condensación genética en el espermatozoide cuando las histonas son reemplazadas por protaminas. Este ARNm se ha descrito que puede tener incluso un efecto deletéreo en el cigoto y se supone que es degradado en este (Boerke et al. 2007).

En segundo lugar, hay ARNm que pueden tener su origen también en las células madre testiculares, pero que si tengan función en el ovocito fecundado. El ejemplo

más evidente es el gen de la PLC ζ , que como ya se ha explicado es probablemente el factor espermático activador de ovocitos (Boerke et al. 2007, Kumar et al. 2013).

Por último, se describe un grupo de ARNm producidos por otros tipos celulares que son incluidos en el espermatozoide, quien a su vez los introduce en el ovocito, en el que pueden ejercer alguna función durante la embriogénesis temprana (Boerke et al. 2007, Kumar et al. 2013).

La importancia de los ARNm durante el desarrollo embrionario se ha descrito en diversos estudios (Avendano et al. 2009, Sone et al. 2005). Además, se ha demostrado que alteraciones en la cantidad y composición de los ARNm espermáticos pueden indicar alteraciones en la espermiogénesis que afecten al desarrollo del embrión.

Nuestro grupo ha caracterizado el transcriptoma de las muestras de semen óptimas para iniciar un embarazo tras una TRA (Garcia-Herrero et al. 2010b, 2011), lo que demuestra que los ARNm espermáticos juegan algún papel en la consecución de un embarazo.

ARN no codificantes. También se han encontrado poblaciones de ARN no codificantes en los espermatozoides cuya posible función sea la regulación post transcripcional de la expresión génica, ya sea durante la espermiogénesis o en el ovocito en metafase II (Jodar et al. 2013, Kumar et al. 2013). Algunos de los más frecuentes encontrados en espermatozoides humanos son:

miARN: Los micro ARN se ha demostrado que modulan varios estadios de la espermiogénesis. Su función típica es la de regular la expresión génica mediante la inhibición o activación de la traslación de determinados ARNm (revisado en (Jodar et al. 2013)). El miARN más abundante encontrado en espermatozoides de

humanos es miR-34c (Krawetz et al. 2011), del que se ha descrito que tiene una función esencial en la primera división de cigoto de ratón (Liu et al. 2012).

piARN: Los ARN asociados a Piwi se han detectado en espermatozoides de varias especies animales. Se les atribuye función de protección del genoma en el desarrollo embrionario temprano (revisado en (Jodar et al. 2013)).

También se ha señalado la presencia de otros elementos menos frecuentes y peor descritos, como: elementos repetitivos, transponibles, elementos asociados a promotores, etc. (Jodar et al. 2013).

Los ARN espermáticos como modificadores de la epigenética

Los ARN parecen tener un papel dinámico en el desarrollo embrionario. Se ha propuesto como posible función el marcaje de las secuencias de ADN que deben permanecer unidas a histonas en el espermatozoide, hecho que se ha descubierto relevante para el correcto desarrollo de un embrión (Hamatani 2012).

Durante la espermiogénesis, se produce un aumento de la compactación de la cromatina de 6-20 veces, por el reemplazo de las histonas por protaminas. Sin embargo, alrededor de un 5% de la cromatina permanece unida a histonas. Recientemente, se ha descubierto que estas regiones que permanecen unidas a histonas no son regiones aleatorias, sino genes importantes y relevantes para el desarrollo embrionario, promotores de miARN y genes improntados (Hammoud et al. 2009).

Se sugiere que los ARN de los espermatozoides protegen estas regiones de la transición histona-protamina para así hacerlas más accesibles durante las primeras etapas del desarrollo embrionario (Hamatani 2012).

Por lo tanto, parece que los ARN de los espermatozoides son importantes también en las primeras etapas del desarrollo embrionario a nivel epigenético (Carrell and Hammoud 2010).

En general se han descrito dos tipos de efectos diferenciados tras la formación del cigoto causados por alteraciones en los espermatozoides y que muestran la importancia/efecto que tiene el espermatozoide en el cigoto y futuro embrión.

Efectos tempranos a nivel de estadio de cigoto. Se sugiere que anomalías en el aparato citoesqueleto-centrosoma del espermatozoide o incapacidad de este por la activación del ovocito, se traducen en cigotos con anomalías y baja velocidad de división en el primer ciclo celular (revisado en (Barroso et al. 2009)).

Efectos tardíos. Se propone que anomalías a nivel de ADN (fragmentación del ADN espermático) o presencia de ARNm aberrantes en los espermatozoides tienen un efecto en el desarrollo embrionario provocando un desarrollo pobre a partir de la transición materno –cigótica (de 4 a 8 células) que lleva a fallos de implantación (revisado en (Barroso et al. 2009)).

4. Métodos diagnósticos de la infertilidad masculina

El factor masculino como causante de la infertilidad de una pareja es difícil de clasificar, siendo en el 10-20% de los casos desconocida la causa que provoca el trastorno, llamada en este caso idiopática (ESHRE 2017). Este dato nos da idea de lo mucho que queda por hacer y estudiar acerca de las alteraciones fisiológicas o moleculares causantes de la infertilidad masculina (van der Steeg, J W et al. 2011).

Cuando una pareja acude a la consulta médica por dificultades para conseguir embarazo, la primera (y en muchos casos única) prueba que se le hace al varón es un espermiograma que debe ir acompañado de la anamnesis y de la exploración física, con la intención de buscar el origen de la alteración en la fertilidad de la pareja.

4.1 El espermiograma

La única herramienta diagnóstica de la infertilidad masculina aceptada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es el análisis básico del semen o espermiograma.

Según la OMS para una correcta evaluación de una muestra de semen, esta debe ser recogida después de un mínimo de dos días y un máximo de 7 días de abstinencia sexual. Debe ser recogida por masturbación y en un contenedor estéril, sin tóxicos para los espermatozoides (World Health Organization. 2010).

El análisis del semen comienza con un examen macroscópico unos 30 minutos después de la recogida. En este examen se evalúa: la completa **licuefacción** de la muestra, la **viscosidad** y la **apariencia** de la muestra, esta última ha de ser homogénea y gris opalescente. El **volumen del eyaculado** ha de medirse de manera precisa pues de él dependen cálculos posteriores. El **pH** es la última de las

mediciones macroscópicas y ha de ser superior a 7.0 (World Health Organization. 2010).

El análisis microscópico consiste en la evaluación de los parámetros con mayor significancia clínica: la **movilidad** de los espermatozoides, que puede ser progresiva (movimiento activo y lineal o en círculos amplios), no progresiva (el resto de movimientos sin progresión) o inmóviles (ausencia de movimientos). La **vitalidad**, que evalúa si los casos de elevada inmovilidad es debida a la presencia de células muertas. La **concentración** de espermatozoides (y de otros tipos celulares indicativos de diferentes patologías). Y la **morfología** de los espermatozoides; se ha de valorar si encajan en los criterios de normalidad establecidos por la OMS, en las tres regiones del espermatozoide: cabeza, pieza media y cola (morfología recogida en el apartado 2.1 de la Introducción), si no cumplen alguno de los criterios se considera espermatozoide anormal y se ha de registrar cuál de las tres regiones es la afectada por la/las anomalía/s (World Health Organization. 2010).

Por último también se evalúa al microscopio la presencia de aglutinados (espermatozoides móviles unidos entre sí) o agregados (espermatozoides unidos pero inmóviles)(World Health Organization. 2010).

Límite de referencia inferior	
Volumen	1,5ml
Concentración	15 millones/ml
Movilidad total	40%
Movilidad progresiva	32%
Vitalidad	58%
Formas normales	4%

Tabla 2 Valores límite inferior de referencia de los principales parámetros de calidad espermática (World Health Organization. 2010).

La OMS ha establecido una serie de nombres para identificar las alteraciones en el espermiograma y definir las distintas patologías seminales (World Health Organization. 2010).

Término	Definición
Astenozoospermia	Porcentaje de espermatozoides móviles progresivos por debajo del límite de referencia
Azoospermia	Ausencia de espermatozoides en el eyaculado
Criptozoospermia	Ausencia de espermatozoides en preparaciones en fresco, pero se observan en el pellet tras centrifugación
Hipospermia	Volumen del eyaculado por debajo del límite de referencia
Necrozoospermia	Bajo porcentaje de espermatozoides vivos y presencia de muchos inmóviles en el eyaculado
Oligozoospermia	Número total de espermatozoides por debajo del límite de referencia
Teratozoospermia	Porcentaje de espermatozoides con morfología normal por debajo del límite de referencia

Tabla 3 Nomenclatura de las distintas patologías en función de las características seminales, establecidas por la OMS. Modificado de OMS, 2010 (World Health Organization. 2010).

Se crean además combinaciones de estos términos cuando más de una alteración está presente en una muestra, como por ejemplo: oligoastenoteratozoospermia (World Health Organization. 2010).

Es este un test sencillo, de bajo coste económico y bastante informativo. Sin embargo, tiene considerables limitaciones, como son: su escaso poder predictivo para estimar las posibilidades de conseguir una gestación, ya que una muestra de semen valorada mediante un espermiograma como normal no es garantía de éxito, en cuanto a lograr embarazo. Otra limitación es que es un análisis sujeto a la valoración del personal del laboratorio, por lo tanto, subjetivo. Por ello gran parte de la comunidad científica cuestiona su auténtica valía (Eliasson 2010, Lefievre et al. 2007, Lewis 2007, Nallella et al. 2006).

La causa de estas limitaciones es que este test no evalúa factores fisiológicos y/o moleculares de la muestra (Lefievre et al. 2007, Lewis 2007). Por esta razón, muchas

son las líneas de investigación que van encaminadas a desarrollar una herramienta diagnóstica más objetiva, precisa y fiable, basada en la fisiología espermática.

4.2 Nuevos métodos diagnósticos

Las técnicas diagnósticas disponibles para complementar al espermiograma son:

4.2.1 Evaluación de la fragmentación del ADN

Uno de los más estudiados y a la vez más controvertido es la determinación de la fragmentación del ADN espermático.

Cómo ya se ha mencionado, casi todo el ADN espermático se encuentra altamente compactado lo que le protege de agentes externos, sin embargo, existen ciertas regiones menos compactadas que son susceptibles de sufrir roturas debido a causas muy variadas: alteraciones en la espermatogénesis (Carrell et al. 2007), apoptosis abortiva, estrés oxidativo (Muratori et al. 2015), exposición a agentes gonadotóxicos (Specht et al. 2012) o incluso debido a alteraciones genéticas que causan deficiencias en las protaminas (Gonzalez-Marin et al. 2012).

Existen varios test para evaluar el daño del ADN, sin embargo, como se aprecia en la Tabla 4, cada test mide diferentes parámetros, esto hace que sea difícil llegar a un consenso en cuanto a si existe asociación entre la alta fragmentación del ADN de los espermatozoides y la infertilidad masculina. Además, el ovocito tiene cierta capacidad de reparación de dicho daño, por lo que se hace difícil establecer si una mala calidad embrionaria puede ser debida a un exceso de ADN espermático fragmentado o a una pobre calidad ovocitaria que lo incapacita para su reparación (Meseguer et al. 2011).

TEST	¿Qué detecta?	¿Cómo?	Medición
Commet Assay	Roturas simples y de doble cadena	Electroforesis en gel, mide la distancia de migración de los fragmentos de ADN (Erenpreiss et al. 2006)	Mayor migración
Ensayo TUNEL (<i>deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labeling</i>)	Roturas de cadena doble y simple	Por incorporación de nucleótidos marcados a los extremos de las roturas (Erenpreiss et al. 2006)	Mayor fluorescencia
SCSA (<i>Sperm Chromatine Structure Assay</i>)	La susceptibilidad del ADN para ser desnaturalizado (detección indirecta)	Evalúa el color que emite el naranja de acridina tras la desnaturalización del ADN, según este unido a cadena doble o sencilla de ADN(desnaturalizado) (Erenpreiss et al. 2006)	Mayor fluorescencia en color anaranjado
SDC (<i>Sperm Chromatin Dispersion</i>) o test del Halo	La descondensación de la cromatina (detección indirecta)	Mide la dispersión de la cromatina, por el halo que se forma al someterlo a soluciones de desnaturalización y lisis (Collins et al. 2008)	Menor halo de dispersión
DBD-FISH (<i>DNA Breakage Detecion-FISH</i>)	Roturas de cadena simple y doble	Mide la fluorescencia emitida por sondas que se unen a los extremos libres de cadena única que se forman en las roturas (Fernandez et al. 2000)	Mayor fluorescencia

Tabla 4 Resumen de las técnicas para la detección del daño del ADN más utilizadas.

Algunos estudios centrados en evaluar la relación entre la fragmentación del ADN de los espermatozoides y el éxito reproductivo, encuentran una relación entre ambos hechos (Bungum et al. 2007, Bungum 2012), pero en la mayoría el nivel de evidencia es insuficiente para establecer la fragmentación del ADN como marcador predictivo del éxito reproductivo (Collins et al. 2008, Esbert et al. 2011, Meseguer et al. 2011). Así lo considera y expone la ASRM en su documento consenso de 2013 (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2013a).

4.2.2 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es una condición provocada por un desequilibrio entre la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la capacidad biológica de defensa ante estas especies y de reparación de sus daños.

Esto ocurre en todas las células cuya fuente de energía es el oxígeno, sin embargo, los espermatozoides son más susceptibles a este daño por su baja cantidad de citoplasma que no le permite almacenar suficientes sistemas enzimáticos de reparación y sus membranas ricas en ácidos grasos poliinsaturados (Saleh and Agarwal 2002).

Un nivel controlado de ERO en los espermatozoides es importante para determinados procesos fisiológicos como; la capacitación, hiperactivación, la reacción acrosómica y la fusión entre espermatozoide y ovocito (Saleh and Agarwal 2002). Sin embargo, un desequilibrio entre las ERO y los niveles de antioxidantes, provocan alteraciones de diferente grado en los espermatozoides (Agarwal and Prabakaran 2005).

Una de las principales defectos que causa un aumento excesivo de ERO en los espermatozoides, es lo que se conoce como peroxidación lipídica que es una cascada de reacciones químicas desencadenada por el ataque de estas ERO a los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana plasmática y que provoca una disminución de la fluidez de la membrana, aumento de la permeabilidad inespecífica a iones e inactivación de receptores y enzimas unidas a membrana (Agarwal et al. 2014, Alvarez et al. 1987). Otras de las alteraciones que causan las ERO son la fragmentación del ADN espermático y la iniciación de diferentes rutas de muerte celular o apoptosis.

No existe una técnica universalmente aceptada para medir el estrés oxidativo en las muestras de semen. Uno de los métodos existentes es la medición de uno de los productos oxidativos de las ERO sobre el ADN de los espermatozoides, la 8-hydroxydeoxyguanosina (8-OHdG) (Santiso et al. 2010). Existe un kit para la valoración de la presencia de 8-OHdG que se basa en la evaluación de muestras

mediante citometría de flujo, previo tratamiento de las mismas con anticuerpos específicos para la 8-OHdG conjugados con fluorocromos (Garrido et al. 2004).

Aunque hay estudios que demuestran la relación entre la infertilidad masculina y el estrés oxidativo (Aitken et al. 2010, Kodama et al. 1997, Shen et al. 1999, Thomson et al. 2011), los datos clínicos son todavía insuficientes y la ausencia de consenso hace que sean necesarios más estudios para introducir este parámetro como marcador de calidad seminal.

4.2.3 Determinación de perfiles de calidad espermática.

La finalidad de estos estudios es la de definir una huella de calidad del semen para desarrollar test diagnósticos que sean capaces de identificar de manera objetiva y fiable qué muestras son verdaderamente competentes, aportando al espermiograma algunas de las características que le faltan.

Dependiendo de las moléculas estudiadas para definir dichas huellas de calidad, se pueden encontrar muy diversos estudios, en busca de diferentes perfiles concretos:

4.2.3.1 Perfil proteico (proteoma)

De las ciencias ómicas, la que estudia el conjunto de proteínas que se expresan de un genoma, es la proteómica.

Hace ya más de 10 años que se comenzó con el estudio de la proteómica en los espermatozoides. El hecho de ser células de gran accesibilidad y fácilmente purificables, les hacen ser un tipo celular especialmente adecuado para esta clase de análisis (Zhu et al. 2013).

La evolución en el estudio de la proteómica es paralela al desarrollo de las técnicas de detección de proteínas, marcando un claro punto de inflexión, la aparición de la espectrometría de masas (MS) (Agarwal et al. 2014).

El primer análisis extenso del proteoma de espermatozoides identificó 1760 proteínas (Johnston et al. 2005). Actualmente, existen muchos estudios que han logrado identificar cientos o incluso miles de proteínas en diferentes condiciones (Baker et al. 2007, de Mateo et al. 2007, Secciani et al. 2009, Wu and Chu 2008, Zhu et al. 2013).

A día de hoy ya hay diversos estudios que han establecido las diferencias en el perfil proteico de varones infértiles y fértiles (Martinez-Heredia et al. 2008, Rivera 2017, Xu et al. 2012, Zhu et al. 2013).

Además, la identificación de las proteínas presentes en muestras de espermatozoides fisiológicamente competentes nos puede ayudar a determinar qué proteínas están involucradas en la función espermática y de esta manera identificar nuevos biomarcadores individuales de calidad.

4.2.3.2 Perfil lipídico

Existen varios estudios que analizan el conjunto de lípidos presentes en los espermatozoides, con las mismas técnicas utilizadas para la detección de proteínas. Los lípidos de la membrana de los espermatozoides son un factor importante en muchas de sus funciones, como son la capacitación, la interacción entre espermatozoide y ovocito y en último lugar, la fecundación (Kawano et al. 2011).

También se ha relacionado la presencia de determinados lípidos en la membrana de los espermatozoides con su resistencia a los procesos de congelación-descongelación. Incluso se ha propuesto la adición de lípidos concretos (ej.; ácido docosahexaenoico-DHA-) a la muestra de semen para aumentar así su resistencia y

recuperar una muestra de espermatozoides, no tan mermada en cuanto a su calidad, tras la descongelación (Kaeoket et al. 2010, Maldjian et al. 2005).

Nuestro grupo ha encontrado un perfil diferencial entre muestras que dan lugar a embarazo y muestras que no lo hacen. Encontrando 16 lípidos y 4 clases lipídicas estadísticamente sobreexpresadas en muestras que no consiguen embarazo (Rivera et al. 2013, Rivera 2017).

4.2.3.3 Perfil transcriptómico

La transcriptómica es la parte de las ómicas que estudia el conjunto de ARNm o transcritos que se expresan en una célula en determinadas condiciones, en un momento concreto.

Como ya se ha comentado la presencia de ARNm en los espermatozoides es un hecho claramente demostrado, a pesar de que su función todavía genera debate (Avendano et al. 2009, Barroso et al. 2009, Boerke et al. 2007, Kumar et al. 2013, Sone et al. 2005).

De las muchas técnicas disponibles para evaluar los transcritos de una célula, la única capaz de elaborar un perfil completo de ARNm de una célula son los microarrays.

Desde el descubrimiento de la presencia de ARNm en los espermatozoides, muchos grupos han intentado establecer relaciones entre el perfil transcriptómico (o conjunto de ARNm en una muestra de semen) con diferentes parámetros relacionados con la infertilidad masculina (Tabla 5).

Referencia	Población estudiada
(Wang et al. 2004)	Varones sanos con muestras de semen normales y con <u>movilidad</u> espermática baja (criterios OMS 1999)
(Platts et al. 2007)	Varones con fertilidad probada y varones con muestras de semen con <u>teratozoospermia</u> (criterio OMS 1999)
(Linschooten et al. 2009)	Varones sanos <u>fumadores</u> y no fumadores
(Nguyen et al. 2009)	Varones con antecedentes de <u>criptorquidia</u> y varones sin estos antecedentes y muestras normales (criterios OMS 1999)
(Garrido et al. 2009)	Varones <u>con infertilidad idiopática</u> (normozoospermia) y donantes con fertilidad probada (criterios OMS 1999)
(Garcia-Herrero et al. 2010a)	Varones <u>con infertilidad idiopática</u> (normozoospermia) y donantes con fertilidad probada, antes y después del <i>Swim-up</i> (criterios OMS 1999)
(Garcia-Herrero et al. 2010b)	Varones que <u>consiguen embarazo tras inseminación homóloga</u> y pacientes que no lo consiguen.
(Garcia-Herrero et al. 2011)	Varones que <u>consiguen embarazo tras ICSI</u> con ovocitos donados y varones que no lo consiguen, utilizando muestras de semen congeladas y en fresco.
(Bonache et al. 2012)	Donantes con muestras normozoospermicas (OMS 1999) con baja, media y alta <u>tasa de embarazo tras inseminación artificial</u>
(Jodar et al. 2012)	Donantes con fertilidad probada, pacientes infértiles con <u>astenozoospermia</u> y pacientes infértiles con normozoospermia (criterios OMS 2010)
(Montjean et al. 2012)	Varones con fertilidad probada y muestras de semen normales y pacientes infértiles con <u>oligozoospermia</u> (criterios OMS 1999)
(Metzler-Guillemain et al. 2015)	Varones con muestras de semen normales <u>fumadores</u> y no fumadores (criterios OMS 2010)
(Bansal et al. 2015)	Varones con fertilidad probada, pacientes infértiles con muestras normales y pacientes con <u>astenozoospermia</u> (criterios OMS 1999)

Tabla 5 Resumen de los estudios más relevantes a cerca del transcriptoma de los espermatozoides humanos.

Algunos de estos estudios están encaminados a encontrar un perfil de transcritos que se definan como los necesarios y suficientes para que una muestra de espermatozoides sea capaz de dar lugar a una gestación (Garcia-Herrero et al. 2010a, 2010b, 2011).

En la búsqueda de este conjunto de transcritos espermáticos fundamental para un correcto desarrollo embrionario, nuestro equipo de investigación definió los grupos de ARNm que se sobreexpresaban o expresaban de manera diferencial entre

muestras de espermatozoides que tras una TRA lograban o no un embarazo evolutivo (García-Herrero et al. 2010a, 2010b, 2011).

Del estudio exhaustivo de estos listados, se han seleccionado dos moléculas para su estudio en profundidad, como potenciales marcadores de calidad seminal y que son el objeto de este estudio. Los motivos de su elección, así como sus características más importantes se mencionan a continuación.

-PLA2G2A (Phospholipase A2, group IIA)

Las fosfolipasas son un grupo muy diverso de enzimas cuyas principales funciones son las de modificar la composición de las membranas celulares, intervenir en las vías de señalización y activar la cascada de inflamación. De este extenso grupo, aquellas que hidrolizan el enlace éster sn-2 de los glicerofosfolípidos liberando ácidos grasos y lisofosfolípidos, se conocen como fosfolipasas A2.

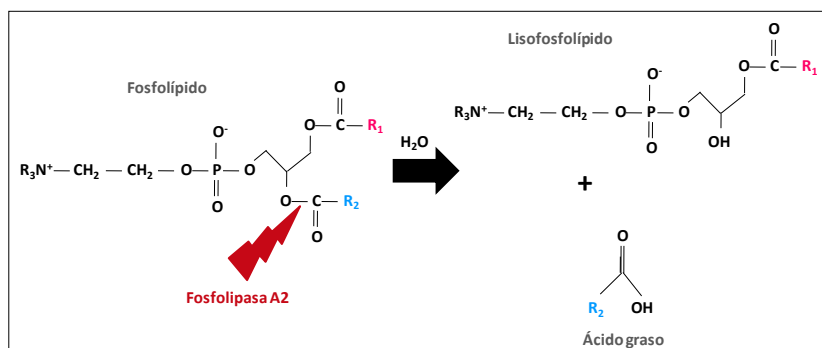


Figura 3 Esquema de la reacción de hidrólisis mediada por PLA2

Las PLA2 se clasifican según su localización celular en secretoras de bajo peso molecular y citosólicas de alto peso molecular y según su dependencia del calcio; calcio-dependientes o calcio-independientes. Por otra parte, según el mecanismo catalítico se clasifican en 16 grupos utilizando número romanos, en la Tabla 6 se muestran las características de cada grupo (García and García Cardona 2009).

Grupo	Miembros del grupo	Variedad	Dependencia del Ca ²⁺
I	IA,IB	Secretora	Dependiente
II	IIA,IIB,IIC,IID,IIE,IIF	Secretora	Dependiente
III	III	Secretora	Dependiente
IV	IVA,IVB,IVC,IVD,IVE,IVF	Citosólica	Dependiente
V	V	Secretora	Dependiente
VI	VIA,VIB,VIC,VID,VIE,VIF	Citosólica/Secretora	Independiente
VII	VIIA,VIIB	Citosólica/Secretora	Independiente
VIII	VIIIA,VIIIB	Citosólica	Independiente
IX	IX	Secretora	Dependiente
X	X	Secretora	Dependiente
XI	XIA,XIB	Secretora	Dependiente
XII	XII	Secretora	Dependiente
XIII	XIII	Secretora	Dependiente
XIV	XIV	Secretora	Dependiente
XV	XV	Lisosomal	Independiente
XVI	XVI	Asociada a membrana	Dependiente

Tabla 6 Clasificación de las PLA2

Algunos de los procesos en los que participan las PLA2, debido a su actividad catalítica, son: la comunicación y señalización celular, intervienen en la inmunidad innata actuando contra las membranas de los agentes patógenos o células neoplásicas, participan también en la permeabilización cutánea, en el remodelado de membranas en general y en procesos apoptóticos (García et al. 2008).

Así mismo, se ha descrito su participación en la fertilidad humana (García et al. 2008). Concretamente se ha visto que tienen relevancia en tres procesos que implican fusión de membranas; en la reacción acrosómica de los espermatozoides (Gramajo-Buhler et al. 2016, Pietrobon et al. 2005, Riffo and Parraga 1997, Shi et al. 2005), en la fusión entre gametos (Lessig et al. 2006, Riffo and Parraga 1997) y por último, también se han encontrado en endometrio durante la ventana de implantación, lo que sugiere un posible papel en la implantación embrionaria (Allegra et al. 2009).

Una de estas enzimas, la PLA2G2A, se propone como marcador de mala calidad seminal ya que en un estudio que comparaba los ARNm de muestras de espermatozoides que lograban o no un embarazo evolutivo tras una TRA, se observó el siguiente hecho:

Los espermatozoides utilizados para un tratamiento de fecundación *in vitro* (FIV) convencional, con un resultado positivo (embarazo) presentaban 42 veces menos ARNm codificante para PLA2G2A, que aquellos espermatozoides que tras el mismo tratamiento, no conseguían embarazo (García-Herrero 2012).

Este miembro de la familia de las PLA2, como se muestra en la Tabla 6, depende del calcio para ejecutar su actividad catalítica y en su mayoría es una variedad secretora de bajo peso molecular (14KDa), sin embargo, también se ha encontrado asociada a membrana. Tanto la secuencia de aminoácidos, como la localización subcelular y otras características de esta proteína han sido consultadas y están disponibles en la base de datos UniProt (www.uniprot.org/uniprot) con el identificador P14555.

PLA2G2A se encuentra en el torrente sanguíneo en una concentración muy baja en condiciones normales, sin embargo se detecta una elevación significativa en procesos inflamatorios como; sepsis, enfermedad de Crohn, asma, colitis ulcerosa, artritis, etc. Este hecho evidencia la intervención de esta enzima en los procesos inflamatorios, siendo esta una de sus principales funciones junto con la de potente bactericida (Kallajoki et al. 1998).

También se ha descrito en otros fluidos humanos como el plasma seminal, dónde se encuentra en mayor concentración y dónde se le atribuye función de protección frente a posibles invasiones bacterianas (Kallajoki et al. 1998, Murakami et al. 2011). Su producción ha sido localizada en las células epiteliales de las glándulas prostáticas, desde las cuales es liberada al líquido seminal (Kallajoki et al. 1998).

Por otro lado, se ha relacionado con el sistema reproductor femenino, ya que se ha encontrado tanto en endometrio receptivo de mujeres que logran embarazo tras ICSI (Allegra et al. 2009), como en endometrio extrauterino (Kocbek et al. 2015). Son necesarios más estudios para aclarar su posible papel en la implantación embrionaria.

Debido a su evidente presencia en plasma seminal, a su actividad catalítica, que puede ser relevante para el proceso de fecundación a distintos niveles (reacción acrosómica, fusión de gametos, señalización celular) y sobre todo, debido al descubrimiento de que espermatozoides con mayor capacidad reproductiva presentan menores niveles del mensajero que codifica para esta proteína, es a nuestro juicio un candidato perfecto para ser un marcador de calidad seminal.

-CD84

CD84 pertenece a la familia de moléculas linfocitarias activadoras de señales (SLAM). Esta familia regula una gran variedad de respuestas inmunes como; activación de células T, generación de las células B de memoria, producción de anticuerpos y activación de las células *natural Killers* (NK) (Yan et al. 2007).

En cuanto a su estructura son glicoproteínas de superficie celular que se caracterizan por una porción extracelular con dos o cuatro dominios similares a inmunoglobulinas, un segmento transmembrana y otro intracitoplasmático, el cual contiene uno o más motivos basados en tirosinas, con un papel fundamental en la transmisión de señales (Cannons et al. 2011)(Figura 4).

Todos los miembros de esta familia se encuentran codificados en el cromosoma 1, tanto en humanos como en ratón. La característica más peculiar de esta familia es que la mayoría, además de ser receptores de membrana, pueden actuar como sus propios ligandos (Cannons et al. 2011).

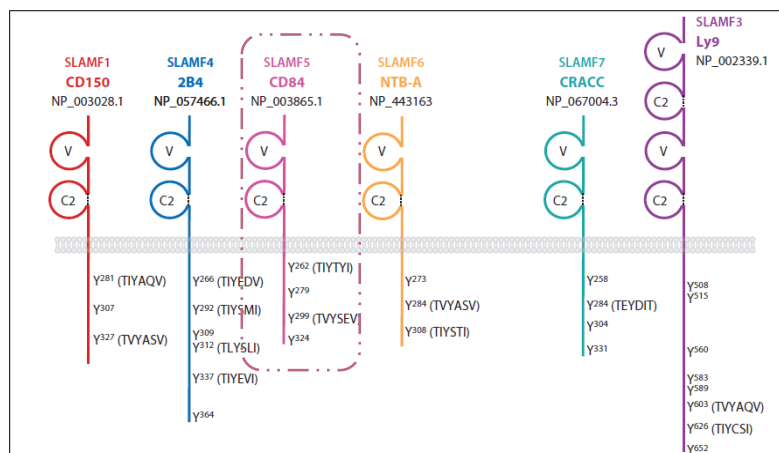


Figura 4 Estructura de las moléculas de la familia SLAM

En cuanto al CD84 se ha identificado en una gran variedad de tipos celulares; NK, linfocitos B y T, monocitos, plaquetas, macrófagos, células dendríticas, granulocitos, mastocitos, eosinófilos, basófilos y neutrófilos (Cannons et al. 2011, Nichols et al. 2005). Se han definido cinco isoformas diferentes del ARNm que codifican la molécula con diferentes longitudes del segmento intracitoplasmático (Palou et al. 2000).

En cuanto a su estructura sigue los patrones de las moléculas de su familia con dos dominios extracelulares y dos motivos ricos en tirosinas en el segmento intracelular (Figura 4).

Las funciones de este receptor permanecen todavía en estudio, aunque por similitud con otras moléculas de su familia se le atribuyen papeles en la activación de leucocitos. Zaiss y colaboradores sugieren que CD84 pueda ser utilizado como marcador de diferenciación de células hematopoyéticas, ya que encuentran un aumento de esta molécula durante la diferenciación de células madres pluripotentes hacia otras más comprometidas (Zaiss et al. 2003). Por otra parte,

también se ha descrito que esta molécula es necesaria para el contacto prolongado entre linfocitos B y T, requerido para la inmunidad humoral (Cannons et al. 2010).

A pesar de que hay varios estudios que proponen diversas funciones potenciales, todavía queda mucho por estudiar hasta comprender completamente los procesos en los que interviene CD84.

Esta molécula no se ha descrito asociada a ningún proceso reproductivo, ni en ningún tejido del aparato reproductor masculino o femenino. Sin embargo, y como en el caso anterior, los estudios de microarrays de ARN de muestras seminales, demostraron que esta molécula se expresaba exclusivamente en muestras de espermatozoides que daban lugar a un embarazo, fuera cual fuera la TRA utilizada (Garcia-Herrero 2012).

4.2.4 Potenciales biomarcadores individuales

Se han propuesto como potenciales marcadores de calidad seminal una gran variedad de moléculas, algunas de ellas implicadas en distintas funciones espermáticas y otras relacionadas por estudios clínicos con buenos resultados reproductivos. Sin embargo, la relación de estas moléculas con la infertilidad masculina es, en la mayoría de los casos, indirecta y está poco estudiada. Algunos ejemplos de estas moléculas son:

- Factor activador plaquetario (PAF). Es un fosfolípido descrito en espermatozoides humanos, cuya correlación positiva con resultados de embarazo tras TRA (Roudebush and Purnell 2000) y con el potencial fértil del varón (Toledo et al. 2003) ha sido definida por varios grupos de investigación.

- Acrosina. Se ha relacionado desde hace más de dos décadas con la capacidad de los espermatozoides para penetrar en la zona pelúcida del ovocito.

Sin embargo, los resultados tras tratamientos de FIV son controvertidos (Garrido et al. 2008).

- Colesterol. Es el lípido más presente en la membrana de los espermatozoides, cuya proporción en membrana se ha relacionado de manera directa con la morfología de los espermatozoides y su potencial fértil (Meseguer et al. 2004).

- Ubiquitina (UBQ). Es el biomarcador individual de calidad seminal más y mejor estudiado.

La ubiquitina es una pequeña proteína de 76 aminoácidos descubierta en 1975. Con un peso molecular de 8,5kDa se encuentra en la mayoría de células eucariotas y es una de las proteínas más altamente conservadas. Una de sus características más especial es su elevado número de residuos de lisina que le permite unirse a través de ellos a otras moléculas de UBQ formando cadenas (Sutovsky 2011).

Esta pequeña proteína pertenece al sistema ubiquitina-proteasoma que es el principal sistema de degradación sustrato-específico de proteínas en la célula. El proceso por el cual un sustrato es marcado para ser degradado por este sistema se conoce como ubiquitinación.

La ubiquitinación son una serie de reacciones enzimáticas, alguna de ellas dependientes de ATP, por las cuales a un sustrato se le añaden una serie de moléculas de UBQ formando una cadena, que es la señal para que el proteasoma 26S degrade dicho sustrato (Hou and Yang 2013, Sutovsky 2011).

El proteasoma 26S es un complejo compuesto por: la subunidad central 20S con forma de barril y actividad catalítica y las subunidades reguladoras 19S localizadas en los extremos del barril y cuya función es la de reconocer los sustratos

poliubiquitinados y transferirlos al núcleo catalítico donde serán degradados (Sutovsky 2011, Zimmerman and Sutovsky 2009).

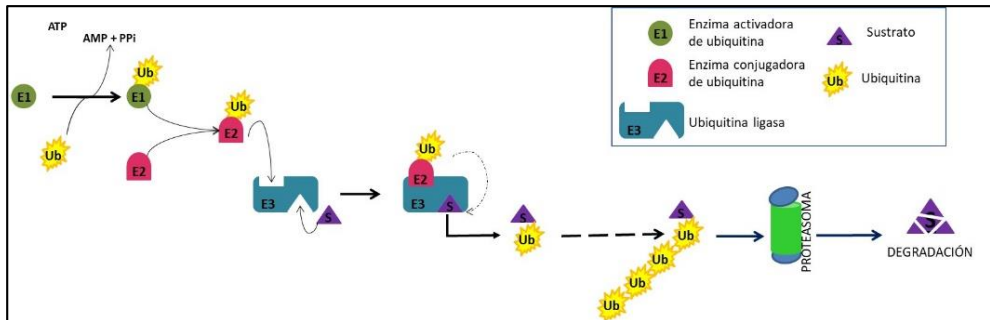


Figura 5 Esquema del mecanismo de acción del sistema ubiquitina-proteasoma.

La importancia de este sistema es tal, que sus descubridores (A. Ciechanover, A. Hershko y I. Rose) fueron en 2004 galardonados con el premio Nobel de Química.

Esta ruta de señalización y destrucción/reciclado de proteínas es responsable de la regulación de gran cantidad de procesos fisiológicos que tienen lugar en las células. Además, alteraciones en las funciones del sistema ubiquitina-proteasoma se han relacionado con diferentes tipos de cáncer, con enfermedades como el Síndrome de Angelman y de Liddle o con la fibrosis quística. En todas estas enfermedades ya sea por mutaciones directas en algún componente del sistema o en el sustrato, se provocan alteraciones de las rutas normales de degradación en las que está involucrado el sistema, provocando las patologías (Glickman and Ciechanover 2002). Por otra parte, se han encontrado acumulaciones de UBQ en determinadas localizaciones celulares, en pacientes con enfermedades neurodegenerativas como son el Alzheimer y Parkinson entre otras (Glickman and Ciechanover 2002).

En la espermiogénesis, la ruta ubiquitina-proteasoma también se ha demostrado que tiene gran importancia a muchos niveles, como son: en la transformación de gonocitos a espermatogonias, en la sustitución de histonas por protaminas, en la

degradación de mitocondrias, en la reducción del centrosoma y en la formación de la cola y del acrosoma, entre otros procesos (Bose et al. 2014, Sutovsky 2003).

Existen diversos estudios que demuestran que este sistema es esencial también para la correcta fecundación en mamíferos. Interviene en procesos como la penetración del espermatozoide en la zona pelúcida, en la capacitación espermática, en la exocitosis acrosómica inducida por el ovocito e incluso en la incorporación del espermatozoide al citoplasma del ovocito (Sutovsky 2011).

Otros muchos estudios evalúan la relación entre la presencia de UBQ en los espermatozoides y la calidad seminal, la mayoría de ellos describen una relación negativa (Sutovsky et al. 2001a, 2001b, 2004, Ozanon et al. 2005, Hodjat et al. 2008), aunque también hay grupos que defienden la relación opuesta (Muratori et al. 2005, 2007, 2015).

El grupo de Sutovsky le atribuye a la UBQ un importante papel como marcador de espermatozoides defectuosos. Este marcaje será identificado en el epidídimo y las células epiteliales del mismo retiraran estos espermatozoides. Sin embargo, una pequeña parte escapan de este mecanismo y son detectados en el eyaculado (Sutovsky et al. 2001a).

A la luz de todos estos estudios, esta molécula tiene un gran potencial como marcador diagnóstico y pronóstico, sin embargo, para establecer de manera definitiva su asociación con la infertilidad masculina, así como su valor predictivo para el éxito de las distintas TRA, es necesaria mucha más información y nuevos estudios.

5. Métodos de selección espermática

Las tasas de éxito de las TRA hoy en día están todavía muy lejos de ser el 100%, y por esta razón muchos grupos están invirtiendo grandes esfuerzos en investigar diferentes métodos que puedan mejorar estas tasas, desde diferentes aproximaciones.

Una de estas aproximaciones es la mejora en la selección de los espermatozoides utilizados para un tratamiento. Los espermatozoides se encuentran en exceso, es decir, son necesarios muchos menos de los que se producen, a diferencia de los ovocitos que son el factor limitante. Por ello, son los espermatozoides los candidatos perfectos para ser sometidos a un “filtro” de selección.

Con la intención de maximizar las posibilidades reproductivas de los pacientes, actualmente existe un amplio abanico de técnicas de selección espermática ya disponibles o en estudio, entre las que se encuentran las que aquí se presentan.

5.1 Selección de espermatozoides con receptores de ácido hialurónico.

El ácido hialurónico (AH) es un polisacárido que se encuentra en la matriz extracelular que rodea al ovocito. Se considera un seleccionador natural, ya que únicamente los espermatozoides maduros, que expresen en su membrana receptores para este polisacárido, serán capaces de atravesar dicha matriz extracelular que protege al ovocito y acceder a él para fecundarlo.

Se ha descrito que la presencia de estos receptores en la membrana de los espermatozoides se relaciona con madurez espermática, mínima fragmentación de ADN y menor frecuencia de anomalías cromosomas (Huszar et al. 2007).

En base a este evento que ocurre *in vivo*, se han diseñado diferentes estrategias para seleccionar espermatozoides en función de la presencia en su membrana de receptores de AH. La técnica más conocida y estudiada es el PICSI (“*physiological*”-

ICSI) que consiste en una placa de cultivo con pequeñas gotas de hialuronano deshidratadas adheridas al fondo de la placa, donde se colocan y seleccionan aquellos espermatozoides que se mueven vigorosamente alrededor de su cabeza anclada al fondo (*PICSI Sperm Selection Device*; MidAtlantic Diagnostic–Origio)(Parmegiani et al. 2012).

Existen numerosos estudios comparando diferentes parámetros que evalúan el resultado de tratamientos utilizando ICSI con y sin selección previa por AH. En algunos de ellos se describe una mejora significativa de la calidad embrionaria y de la tasa de implantación, utilizando la selección por AH (Mokanszki et al. 2014, Parmegiani et al. 2010a, 2010b). Sin embargo, en otros muchos estudios no se han encontrado mejoras en el desarrollo embrionario (Ciray et al. 2008), ni en las tasa de implantación y embarazo clínico (WorriLOW et al. 2013), tampoco en la calidad embrionaria(Majumdar and Majumdar 2013). Donde sí se ha encontrado una mejora utilizando la selección por AH es en la tasa de pérdida de embarazo, dos ensayos clínicos prospectivos y aleatorizados (Majumdar and Majumdar 2013, WorriLOW et al. 2013) coinciden en este resultado.

Las revisiones (McDowell et al. 2014) y meta-análisis (Beck-Fruchter et al. 2016) más recientes concluyen que los resultados encontrados hasta el momento no justifican la utilización de esta técnica de manera rutinaria en todos los ciclos de ICSI.

5.2 Selección morfológica de espermatozoides

Los microscopios invertidos utilizados para seleccionar espermatozoides durante el ICSI, utilizan una óptica que consigue un máximo de 400 aumentos. En el año 2001 Bartoov (Bartoov et al. 2001) y colaboradores introdujeron una tecnología – MSOME (*motile sperm organelle morphology exam*)- que conseguía una magnificación óptica de 6000X, lo que proporcionaba una visión de los

espermatozoides mucho más detallada, sin ser teñidos ni fijados. La aplicación del MSOME a la selección de espermatozoides para su microinyección en el ovocito es lo que se ha llamado IMSI (*intra-cytoplasmic morphologically-selected sperm injection*).

En cuanto al valor clínico de la técnica de IMSI hay todavía bastante controversia. Aunque en los estudios más recientes parece demostrarse que no existe mejora en los resultados clínicos utilizando IMSI en lugar de ICSI (Bradley et al. 2016, De Vos et al. 2013, Gatimel et al. 2016, Leandri et al. 2013), hay algunos estudios que encuentran una mejora significativa en los resultados de los tratamientos con IMSI, sobre todo en casos de infertilidad por factor masculino (El Khattabi et al. 2013, Knez et al. 2012, Souza Setti et al. 2010). En conclusión, son necesarios más ensayos clínicos que ayuden a verificar el valor clínico de esta técnica.

5.3 Selección de espermatozoides no apoptóticos.

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo fisiológico, que induce una serie de alteraciones a diferentes niveles en la célula, que llevan al suicidio de la misma. Algunos de los cambios bioquímicos que experimenta una célula en apoptosis son: activación de la ruta de las caspasas, entrecruzamiento de proteínas, condensación de la cromatina y posterior fragmentación del ADN, expresión de marcadores en superficie para el reconocimiento y fagocitos de la célula apoptótica por otras adyacentes (ej.: fosfatidilserina-PS-), entre otros (Elmore 2007).

Uno de los muchos procesos en los que la apoptosis tiene un papel importante es en la espermatogénesis, controlando la superproducción de espermatozoides en niveles que las células de Sertoli puedan sustentar. También se le ha asignado un posible papel en la eliminación de espermatozoides anormales (Makker et al. 2008, Sakkas et al. 2004).

Se ha descrito en numerosas ocasiones, la presencia en eyaculados humanos de espermatozoides con marcadores típicos de apoptosis como; activación de caspasas, disminución del potencial de membrana mitocondrial y externalización de la PS. Se propone que la presencia de estos espermatozoides pre-apoptóticos en el eyaculado sea causado por un fallo en su eliminación (Makker et al. 2008) y por lo tanto, su presencia sea un factor negativo en la calidad del semen.

Esto concuerda con los numerosos estudios que encuentran una asociación directa entre la presencia de marcadores de apoptosis en eyaculados y parámetros de mala calidad seminal (Gandini et al. 2000, Sakkas et al. 1999). Así como, con una relación también directa, con peores tasas de éxito reproductivo tras TRA (Barroso et al. 2006, Borini et al. 2006, Grunewald et al. 2008).

A la luz de estos resultados, se han dedicado numerosos esfuerzos a disminuir el número de espermatozoides apoptóticos presentes en una muestra de semen, previa a su utilización en cualquiera de las TRA. Una de las estrategias diseñadas para separar los espermatozoides apoptóticos de los no apoptóticos, consiste en aprovechar la alta afinidad que tiene la anexina V por el marcador de apoptosis, PS (Said et al. 2006).

Existen dos técnicas que utilizan como base de la selección la unión Anexina V-PS:

5.3.1 Selección inmunomagnética de espermatozoides mediante columnas de Anexina V.

La técnica más extendida, es la selección celular inmunomagnética o MACS (*Magnetic activated cell sorting*). Este procedimiento se utiliza ya a nivel clínico en distintos ámbitos. Por ejemplo se utiliza con éxito en casos de aislamiento de células progenitoras raras de sangre de cordón umbilical, o cuando se utiliza sangre

periférica para sustituir médula ósea en trasplantes de pacientes sometidos a quimioterapia o radioterapia (Powles et al. 2000, Weissman 2000).

El fundamento de la técnica se basa en la utilización de micropartículas magnéticas de aproximadamente 50nm de diámetro conjugadas con proteínas o anticuerpos específicos, para su unión a las células que expresen determinado marcador de interés. Se requiere de unas columnas para separar físicamente las células, las cuales han de estar sometidas a un intenso campo magnético, suficiente para retener las células unidas a las partículas magnéticas en la matriz de la columna.

De esta manera las células no unidas eluirán de la columna en primer lugar, conformando la fracción negativa, células que no presentan la molécula de interés. Posteriormente, mediante lavados de la columna se recoge la fracción positiva o población celular que presenta el marcador. Ambas fracciones son separadas con elevada pureza, manteniendo la estructura, función y viabilidad celular (Said et al. 2008).

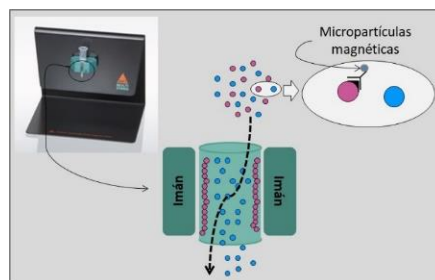


Figura 6 Dibujo esquemático del funcionamiento de la técnica de MACS

En el caso de la utilización del MACS para la selección de espermatozoides no apoptóticos, la proteína que se conjuga con la partícula magnética es la anexina V. Por lo tanto, al hacer pasar la muestra por la columna quedaran retenidos los espermatozoides apoptóticos y eluirán los libres de PS, es decir, los considerados más óptimos para las TRA.

Se ha demostrado la eficacia de esta técnica seleccionando espermatozoides sin marcadores de apoptosis en numerosos estudios (Grunewald et al. 2001, 2009, Lee et al. 2010, Paasch et al. 2003, Said et al. 2006, Tavalaee et al. 2012).

Por otro lado y más interesante, se han realizado varios ensayos comparando los resultados reproductivos de las TRA cuando previamente se aplica o no, la selección por MACS y en la mayoría de los casos se ha visto una mejora (Dirican et al. 2008, Gil et al. 2013, Troya and Zorrilla 2015). Sin embargo, son necesarios más ensayos clínicos prospectivos y aleatorizados para evaluar la verdadera eficacia de esta técnica y para establecer el grupo de pacientes a los que dirigirla, ya que no se ha encontrado mejora en los resultados reproductivos utilizando MACS antes de ICSI cuando la población de varones no está seleccionada (Romany et al. 2014).

La técnica del MACS es una técnica sencilla, barata, con la que se recuperan espermatozoides en perfecto estado, con capacidad fecundante (Grunewald et al. 2008, Lee et al. 2010) y de dar lugar a recién nacidos vivos (Polak de Fried and Denaday 2010, Rawe et al. 2010). Por lo tanto, su utilización para la selección de espermatozoides ya sea libre de marcadores de apoptosis o con otras características de buen pronóstico, nos parece de sumo interés.

Puesto que el único requerimiento es que sean marcadores de membrana, existen múltiples posibles candidatos para establecer nuevos protocolos de selección de espermatozoides que puedan ayudar a mejorar las tasas de las TRA; algunos ejemplos son: la **UBQ**, receptores de AH (ej: CD44), **PLA2G2A** o **CD84**.

5.3.2 Selección con filtros de lana de vidrio.

A diferencia del MACS, en este caso la anexina V se encuentra unida a una fase sólida, la lana de vidrio, por donde se hace pasar la muestra (Grunewald et al. 2007). Este tipo de filtrado presenta las ventajas con respecto al MACS de llevar menos

tiempo su realización y de evitar la posible transmisión al ovocito de esferas magnéticas.

Con esta técnica se ha descrito una mejora en la selección con respecto a otras técnicas ya que se consiguen un mayor porcentaje de espermatozoides con morfología normal (Van den Bergh et al. 1997) y menor daño en el ADN (Sauer et al. 2012). Sin embargo, no se ha encontrado un aumento significativo en la tasa de fecundación, ni en la calidad embrionaria tras ICSI en comparación con los tradicionales gradientes de densidad (Van den Bergh et al. 1997). Este método de selección está todavía en fase experimental y son necesarios nuevos estudios que acrediten su utilidad clínica.

5.4 Selección de espermatozoides por carga eléctrica

Este tipo de selección se basa en el hecho de que los espermatozoides capacitados presentan carga eléctrica negativa (Rosado et al. 1973). Esto es debido a que durante los cambios que se producen en la membrana plasmática en el momento de la capacitación, son liberados a la superficie sialoglicoconjugados (Focarelli et al. 1990). La presencia de estas sialoglicoproteínas en la superficie de los espermatozoides se ha relacionado positivamente con la capacidad fértil de los mismos (Giuliani et al. 2004).

Existen dos técnicas que utilizan la carga eléctrica negativa de los espermatozoides:

5.4.1 Electroforesis espermática.

Ainsworth y colaboradores (Ainsworth et al. 2005) desarrollaron un sistema de separación de espermatozoides en función de su carga y de su morfología. Este sistema (Cell Sorter-10; CS-10) se compone de dos cámaras separadas por una membrana de policarbonato con un poro de 5µm que permite el paso de espermatozoides maduros. Estas cámaras están sometidas a un campo eléctrico

que fuerza a los espermatozoides a pasar a través de la membrana hacia la cámara de recolección.

Existen varios estudios que demuestran que mediante la utilización de esta técnica se consigue una población de espermatozoides con menor fragmentación del ADN (Ainsworth et al. 2005, Aitken et al. 2010, Fleming et al. 2008).

Aunque ya se ha reportado un recién nacido vivo utilizando este método de selección de espermatozoides previo al ICSI (Ainsworth et al. 2007), todavía no se ha realizado ningún ensayo clínico para validar esta técnica ya que presenta algunas limitaciones; como son la complejidad y alto coste del sistema. Por ello, ya hay grupos desarrollando nuevos soportes basados en el mismo principio (Simon et al. 2015, 2016) que puedan solventar estos problemas.

5.4.2 Potencial ζ .

El otro método de selección espermática basado en la electronegatividad de los espermatozoides, es un método mucho más sencillo que apenas requiere de equipamiento alguno. Los espermatozoides maduros presentan una carga eléctrica de -16 a -20 mV (potencial ζ) (Ishijima et al. 1991), que decrece con la capacitación y en exposición a los fluidos del tracto reproductor femenino (Focarelli et al. 1990).

La técnica consiste en depositar la muestra en un tubo cargado positivamente, de esta manera los espermatozoides maduros (electronegativos) se adherirán a las paredes del mismo, que luego son recogidos mediante la adición de suero que neutraliza las cargas (Chan et al. 2006).

Esta técnica recupera un alto porcentaje de espermatozoides con morfología normal, con un correcto contenido en protaminas y con una alta integridad del ADN (Chan et al. 2006, Kheirollahi-Kouhestani et al. 2009, Razavi et al. 2010, Zahedi et

al. 2013, Zarei-Kheirabadi et al. 2012), se ha reportado también una mejora en la tasa de embarazo cuando se utiliza previo a un tratamiento (Kheirollahi-Kouhestani et al. 2009). Así mismo, comparando esta técnica de selección con otras como la selección por AH (Razavi et al. 2010) o los gradientes de densidad (Kheirollahi-Kouhestani et al. 2009, Zarei-Kheirabadi et al. 2012) parece que la separación por potencial ζ recupera espermatozoides de mayor calidad.

Sin embargo, esta técnica presenta algunas desventajas como son la baja tasa de recuperación espermática, que le hace no ser apta para pacientes con oligozoospermia o biopsias testiculares (Chan et al. 2006) y la desviación del ratio espermatozoides portadores de cromosomas X/portadores de cromosoma Y, ya que los espermatozoides con cromosoma X son más electronegativos (Chan et al. 2006, Ishijima et al. 1991).

5.5 Selección de espermatozoides birrefringentes

La birrefringencia es un fenómeno que ocurre cuando un haz de luz incide sobre una estructura anisótropa, la cual es capaz de separar dicho haz de luz en dos. Los espermatozoides maduros debido a sus propiedades anisótropas son birrefringentes (Gianaroli et al. 2008).

Valiéndose de la asociación entre unas correctas morfología y estructuración interna de los espermatozoides y la presencia de birrefringencia, se ha desarrollado un sistema óptico basado en luz polarizada, que permite la identificación y selección de espermatozoides normales (birrefringentes) (Gianaroli et al. 2008).

Gianaroli y colaboradores encuentran una mayor tasa de implantación, embarazo clínico y evolutivo en parejas con infertilidad por factor masculino muy severo utilizando la selección por birrefringencia previa a un tratamiento de ICSI (Gianaroli et al. 2008). Incluso hay estudios que determinan que la localización de la

refringencia en la cabeza del espermatozoide mejora la tasa de éxito del tratamiento (Gianaroli et al. 2010, Vermey et al. 2015). Sin embargo, es una técnica que requiere equipamiento adicional, más tiempo y todavía no hay suficientes evidencias de su validez clínica.

5.6 Selección mediante microespectroscopía Raman

La espectroscopía de Raman se basa en el análisis de la luz que dispersa un material sobre el que se ha hecho incidir una luz monocromática. Una pequeña parte de la luz dispersada sufre un cambio de frecuencia, que se conoce como dispersión de Raman y es dependiente de la composición molecular de la materia (Ellis et al. 2013, Mallidis et al. 2014).

Cuando este fenómeno se utiliza en análisis biológicos es necesario el acoplamiento de un microscopio confocal y es lo que se conoce como microespectroscopía de Raman.

La aplicación de esta técnica a la reproducción asistida es muy reciente y las publicaciones disponibles se centran en describir el perfil de Raman de espermatozoides con alteraciones en la integridad del ADN (Mallidis et al. 2011, Sanchez et al. 2012), con un correcto empaquetamiento del material genético (Huser et al. 2009) y un adecuado estado mitocondrial (Meister et al. 2010).

Sin embargo, las posibilidades de esta metodología son muy amplias. Entre las que se incluye la identificación del espectro de Raman de un espermatozoide capaz de fecundar un ovocito y de dar lugar en último término a un recién nacido vivo (“espectro Raman de calidad espermática”). En función del cual, posteriormente, se podría diseñar un método para seleccionar aquel espermatozoide con dicho espectro y de esta manera aumentar posibilidades de éxito de las TRA.

El nivel de evidencia en la mayoría de las técnicas anteriormente expuestas es bajo, ya que únicamente se dispone de pruebas que valoran de manera indirecta los resultados clínicos tras la utilización de alguna de las técnicas.

La revisión más reciente sobre las técnicas avanzadas de selección de espermatozoides de la biblioteca Cochrane, encuentra que únicamente existen dos ensayos clínicos aleatorizados que versan sobre estas nuevas técnicas de selección. En ambos se evalúa la selección mediante AH y solamente uno de ellos reporta datos de recién nacidos. Esta revisión considera que ninguno de ellos tiene el nivel de evidencia suficiente. Además, no encuentra ningún ensayo del mismo tipo para otras técnicas de selección espermática (espermatozoides apoptóticos, birrefringencia, carga eléctrica) (McDowell et al. 2014).

Existe por lo tanto la necesidad de llevar a cabo más estudios prospectivos y de intervención que permitan evaluar la mejora en los resultados clínicos con la utilización de estas técnicas.

6. Técnicas de reproducción asistida.

La ESHRE en octubre de 2016 publicó una hoja informativa con algunos datos interesantes para la evaluación del impacto actual de las TRA (ESHRE 2017):

- Se estima que desde el primer éxito de las TRA en 1978 han nacido en el mundo 5,4 millones de niños.
- En 2012 España fue el tercer país europeo en número de ciclos realizados, 69.699 ciclos.
- Los países más activos en cuanto a tratamientos de reproducción son Japón y EEUU.
- Se realizan alrededor de 1,6 millones ciclos/año, consiguiendo 400.000 nacimientos/año.

A la luz de estos datos, se hace evidente el crecimiento exponencial que ha tenido la medicina reproductiva en los últimos años, siendo una disciplina relativamente joven, los cambios sociales y culturales han llevado a que se desarrolle muy rápidamente.

Los tres grupos de tratamientos más utilizados se explican a continuación:

6.1 Inseminación Artificial (IA)

Esta técnica consiste en la colocación de una muestra de semen, previamente procesada en el laboratorio, en el tracto reproductor femenino, preferentemente en la cavidad uterina. Este depósito se realiza mediante una fina cánula. Desde allí los espermatozoides harán su recorrido natural hasta alcanzar las inmediaciones del ovocito.

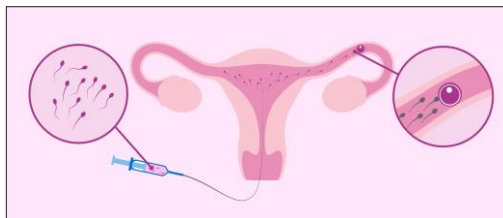


Figura 7 Esquema de IA

La IA es la técnica de indicación en los siguientes casos (Matorras and Hernández 2007):

- Esterilidad masculina leve o moderada; siempre que el recuento de espermatozoides móviles progresivos después del procesado sea mayor a 3 millones por mililitro.
- Incapacidad para depositar el semen en la vagina.
- Esterilidad femenina leve, como disfunción ovárica.
- Esterilidad de origen desconocido; teniendo en cuenta que cuanto mayor sea el tiempo de esterilidad, menores serán las posibilidades de gestación.

Se ha de tener en cuenta que para la realización de esta técnica es preciso que la mujer presente permeabilidad de las trompas y un canal genital normal. Además es recomendable que no presente una reserva ovárica disminuida, ni endometriosis grave y que no supere los 38 años de edad (Matorras and Hernández 2007, Matorras et al. 2011).

En lo que respecta a la tasa de éxito de las IA, son las más bajas de entre todas las TRA. Kupka y colaboradores en su publicación de 2014 concluyen que la tasa de nacimiento de la IA en Europa era del 8,9% (Kupka et al. 2014). En la publicación de 2015 del registro de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), que realiza cada año con los datos de todas las clínicas del país, se presenta una tasa de gestación del 13,5% por ciclo de IA con semen conyugal/homologa (IAH) (Sociedad Española de Fertilidad, SEF 2017).

6.2 FIV convencional

Las técnicas de FIV, como su nombre indica, son aquellas en las que la fecundación del ovocito por parte del espermatozoide se realiza fuera de su entorno natural (el tracto reproductor femenino), concretamente en un laboratorio. Hoy en día existen fundamentalmente dos técnicas de este tipo de aplicación generalizada; la FIV convencional de la que hablaremos en este apartado y el ICSI que se expondrá en el siguiente.

La FIV convencional consiste en la extracción de los ovocitos de los ovarios de la paciente y la incubación de los mismos en pequeñas gotas con espermatozoides previamente procesados en el laboratorio. De esta manera el espermatozoide entra de manera natural en el ovocito, pero teniendo que recorrer un espacio mínimo para alcanzar las proximidades del mismo. Posteriormente el/los embrión/es generados son transferidos al útero materno para su desarrollo y gestación.

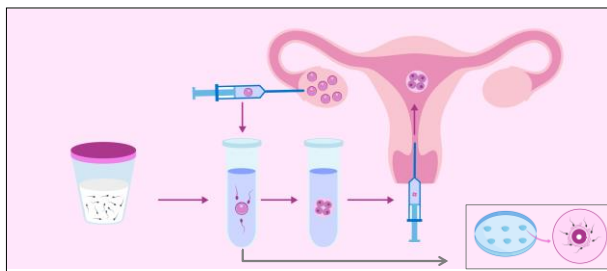


Figura 8 Esquema de FIV convencional

La extracción de los ovocitos se realiza mediante una punción folicular transvaginal con guía ecográfica. La introducción posterior del/los embrión/es en el útero materno se realiza de manera eco-guiada y utilizando un catéter de transferencia.

Los criterios de indicación de esta técnica son (Matorras and Hernández 2007):

- Factor tubárico, que puede estar provocado por obstrucción por adherencias secundarias a una infección, cirugía pélvica o endometriosis.
- Endometriosis.
- Fracaso de IA (tras la realización de los 4-6 ciclos recomendados).
- Baja respuesta folicular tras estimulación ovárica.
- Factor masculino leve o moderado, pero insuficiente para inseminación (móviles progresivos tras la capacitación menor de 3×10^6 /ml).

Las tasa de embarazo por embrión transferido en Europa en 2012 fue del 33,8% (ESHRE 2017) en tratamientos de FIV convencional. Los datos del registro de la SEF de 2015 presentan una tasa de gestación por transferencia del 37,2% teniendo en cuenta todo el territorio nacional (Sociedad Española de Fertilidad, SEF 2017).

6.3 Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

Esta técnica presenta muchos aspectos comunes con la FIV convencional, ya que la obtención de los ovocitos y la posterior transferencia del embrión generado en el laboratorio son procesos compartidos por ambas técnicas.

La diferencia radica en el procedimiento de laboratorio, una vez obtenidos los ovocitos y los espermatozoides procesados, a la luz de un microscopio y con ayuda de micromanipuladores, se toman los ovocitos uno por uno y se inyecta en su citoplasma un único espermatozoide previamente seleccionado por su morfología normal y movimiento progresivo (Figura 9).

Figura 9 Esquema de la convencional y el ICSI



Las principales

diferencia entre la FIV

indicaciones para la

realización de esta técnica son (Matorras and Hernández 2007):

- Fallos de fecundación en tratamientos previos de FIV convencional.
- Factor masculino muy severo.
- Tratamientos de diagnóstico genético pre-implantacional (DGP). En estos casos se realiza una biopsia embrionaria y se analiza para diagnosticar alteraciones genéticas en el embrión. La existencia de células de la granulosa que se quedan alrededor del ovocito en la FIV convencional puede alterar los resultados. Además, en estos casos interesa una tasa de fecundación lo más elevada posible para aumentar el número de embriones analizados.

En cuanto a la tasa de gestación por embrión transferido según la ESHRE en Europa en 2012 fue del 32,2%, cabe destacar que esta tasa está más de un punto y medio por debajo de la de FIV convencional (ESHRE 2017). Los datos del registro de la SEF de 2015 detectan una muy leve disminución de la tasa de gestación por transferencia en España en ese año con respecto a la FIV convencional, siendo en ICSI de un 36,3% (Sociedad Española de Fertilidad, SEF 2017).

Sorprende el hecho de que teniendo ambas técnicas de FIV una tasa de embarazo tan parecida, cada vez se están realizando más ciclos de ICSI. Hecho que demuestran los datos de la evolución desde 1996 cuando el 65% de los tratamientos de FIV eran mediante FIV convencional, hasta 2010 donde el 75% se realizan con ICSI (Kupka et al. 2014).

En muchos centros se realizan prácticamente solo ciclos de ICSI, lo que provoca un amplio debate. Mientras que algunos autores (Abu-Hassan and Al-Hasani 2003, Orief et al. 2004, Tucker et al. 2001) defienden la utilización del ICSI de manera rutinaria, otros proponen su utilización únicamente cuando sea necesario (Bhattacharya et al. 2001, Hodes-Wertz et al. 2012, Oehninger and Gosden 2002, Ola et al. 2001). La ASRM desaconseja su utilización sin una indicación o justificación

como: DGP, factor masculino severo, ovocitos criopreservados o maduración *in vitro* de ovocitos (Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and Society for Assisted Reproductive Technology 2012).

6.4 Donación de gametos

En todas las técnicas hasta este momento presentadas pueden necesitarse gametos donados, cuando uno o los dos gametos no están presentes o no pueden utilizarse.

La donación de gametos demostró su verdadero potencial a partir de la mejora de las técnicas de criopreservación de gametos, ya que esto permitió el almacenamiento de los gametos de donante en bancos específicos hasta su utilización, lo que facilita el trabajo y mejora la rentabilidad de los bancos.

Las recomendaciones para la utilización de semen donado son (Matorras and Hernández 2007):

- Pacientes con azoospermia, en la que no se encuentran espermatozoides ni en el eyaculado, ni en los testículos.
- Pacientes con riesgo de transmisión de enfermedades genéticas, no detectables mediante DGP.
- Mujeres sin pareja o sin pareja masculina.

Las indicaciones para el uso de ovocitos donados son (Matorras and Hernández 2007):

- Mujeres sin función ovárica, ya sea por fallo ovárico prematuro o menopausia.
- Fallos repetidos de FIV con gametos propios.
- Edad materna avanzada.

- Pacientes con riesgo de transmisión de enfermedades genéticas, no detectables mediante DGP.
- Baja respuesta a la estimulación ovárica.
- Ovarios inaccesibles -aunque es una patología rara (<1%).

El artículo 5 de la ley española de reproducción asistida (Ley14/2006) dice acerca de los/las donantes, lo siguiente: *“Los donantes deberán tener más de 18 años, buen estado de salud psicofísica y plena capacidad de obrar. Su estado psicofísico deberá cumplir las exigencias de un protocolo obligatorio de estudio de los donantes que incluirá sus características fenotípicas y psicológicas, así como las condiciones clínicas y determinaciones analíticas necesarias para demostrar, según el estado de los conocimientos de la ciencia y de la técnica existentes en el momento de su realización, que los donantes no padecen enfermedades genéticas, hereditarias o infecciosas transmisibles a la descendencia. Estas mismas condiciones serán aplicables a las muestras de donantes procedentes de otros países; en este caso, los responsables del centro remitir correspondiente deberán acreditar el cumplimiento de todas aquellas condiciones y pruebas cuya determinación no se pueda practicar en las muestras enviadas a su recepción. En todo caso, los centros autorizados podrán rechazar la donación cuando las condiciones psicofísicas del donante no sean las adecuadas”*

6.5 Evaluación de embriones

Una de las labores de rutina de los laboratorios de reproducción asistida ha sido la de observar los embriones generados, con la intención de evaluar su desarrollo.

Gracias a numerosos proyectos en este campo, se han establecido una serie de características morfológicas y cinéticas que son consideradas de buen pronóstico,

es decir, que aquellos embriones que presenten estas características tendrán mayor probabilidad de dar lugar a un recién nacido vivo.

El grupo de ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción) clasifica los embriones en 4 categorías o grupos (A, B, C y D) y cada una representa un potencial de gestación (ASEBIR. 2015).

Categoría ASEBIR	Tasa de gestación clínica	Tasa de recién nacido vivo
A	38,7	35,2
B	30,1	24,7
C	18,9	15,7
D	10,2	10,2

Tabla 7 Clasificación ASEBIR de embriones. Modificado de (Grupo de Interés de Embriología, ASEBIR 2013)

Se han establecidos diversos momentos críticos de observación de los embriones y una morfología óptima para cada uno de esos momentos:

Evaluación en estado de cigoto. Aproximadamente 18 horas tras la inseminación, en el cigoto se ha de distinguir dos corpúsculos polares (CP) y dos pronúcleos (PN) para considerar una fecundación normal (2CP+2PN). Además según ASEBIR se han de tener en cuenta también la morfología de los PN (ASEBIR. 2015), sin embargo, esta característica no es considerada relevante por algunos autores cuando el embrión se va a evaluar nuevamente en días posteriores (Aydin et al. 2011, Nicoli et al. 2013).

Evaluación en día 2 y 3 de desarrollo embrionario. A las 44 horas post-inseminación, el embrión ha de estar en 4 células y pasar a 7-8 unas 24 horas después. Durante estos dos días también se valoran características como: simetría, fragmentación que presenta el embrión, número de núcleos que tiene cada blastómera, presencia de anomalías citoplasmáticas, aspecto de la zona pelúcida y grado de compactación

de las células (ASEBIR. 2015). Todos estos aspectos clasifican al embrión en una u otra categoría de la escala de ASEBIR.

Evaluación en día 5 y 6 de desarrollo. A partir del día 5 la estructura del embrión cambia, las células se diferencian en dos estructuras: la masa celular interna (MCI) que dará lugar al embrión y el trofoectodermo (TE), que es el origen de la placenta y otras estructuras extraembrionarias. El embrión así dispuesto se conoce como blastocisto (ASEBIR. 2015).

A medida que el blastocisto temprano-BT- va desarrollándose libera líquido formando una cavidad, llamada blastocelo (Blastocisto cavitado-BC-). Las células del embrión se van multiplicando haciéndose cada vez más grande, la zona pelúcida va adelgazándose (Blastocisto expandido-BE-), hasta que el embrión es demasiado grande y rompe la zona. El embrión seguirá en expansión saliéndose por la rotura de la zona (Blastocisto eclosionando-BHi-*hatching*) hasta salir completamente (Blastocisto eclosionado-BH-*hatched*).

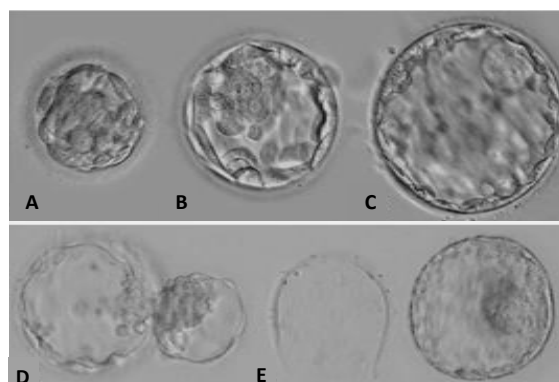


Figura 10 Desarrollo de un blastocisto. **A.** Blastocisto temprano. **B.** Blastocisto cavitado. **C.** Blastocisto expandido. **D.** Blastocisto *hatching*. **E.** Blastocisto *hatched*.

En lo que respecta a la evaluación en estos días, por consenso se ha establecido que han de evaluarse las dos estructuras independientemente la MCI y el TE. Siendo el

TE de mejor calidad aquel con un número de células elevado, elípticas y homogéneo. La MCI ha de tener una forma ovalada y sus células deben estar compactadas. También se tienen en cuenta la fragmentación y vacuolización del embrión en este estadio (ASEBIR. 2015). ASEBIR propone darle al blastocisto en conjunto la calidad del TE, por considerar a este más importante en la implantación embrionaria que la MCI (ASEBIR. 2015).

Se aconseja realizar la evaluación del blastocisto independientemente de los días previos, sin embargo a igualdad de calidad de blastocisto, se recomienda seleccionar en base al histórico de su evolución (ASEBIR. 2015).

La mejor transferencia

La importancia de la correcta categorización de los embriones radica en su utilidad para seleccionar los mejores embriones para transferir, ofreciéndole a la paciente de esta forma las máximas posibilidades de gestación lo antes posible.

Otros aspectos (además de la calidad embrionaria) que influyen en la probabilidad de una gestación tras una transferencia embrionaria son:

Número de embriones a transferir. La ley española sobre técnicas de reproducción humana asistida (Ley14/2006) permite la transferencia de hasta tres embriones. Sin embargo, cada vez más la tendencia de los centros de reproducción asistida es la transferencia de un solo embrión.

A pesar de que la tasa de gestación es menor transfiriendo un único embrión, la tasa acumulada (transferir en fresco uno y en el ciclo posterior otro, previamente congelado) se ha visto que es la misma (Pandian et al. 2013). Además, por otra parte, cuando se realizan transferencias de un único embrión las posibilidades de un embarazo múltiple son menores, evitando de esta manera todos los riesgos que conlleva este tipo de embarazos.

Día de desarrollo embrionario en el que realizar la transferencia. Este es un tema que ha suscitado un amplio debate durante los últimos años. Mientras algunos grupos defienden la transferencia en estadio de blastocisto apoyándose en los siguientes argumentos: existe una mayor sincronía con el endometrio, se realiza una mejor selección embrionaria y menor contractibilidad uterina en el momento de la transferencia (Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology 2013). Los detractores de la transferencia en estadio de blastocisto refieren mayor incidencia de gemelos monocigóticos (Knopman et al. 2010, Milki et al. 2003), mayores riesgos obstétricos y perinatales (Dar et al. 2014, Ginstrom Ernst et al. 2016) y mayores riesgos epigenéticos (Velker et al. 2012).

La tendencia general es la de transferir en estadio de blastocisto, ya que la tasa de gestación y recién nacido vivo es mayor que transfiriendo en estadios más tempranos (Azimineko et al. 2015, Glujovsky et al. 2016). Sin embargo, este hecho no está consensuado ya que hay grupos que presentan resultados en los que no existen diferencias en las tasas de gestación (Martins et al. 2017), incluso investigadores que consideran que los riesgos de las transferencias en blastocisto hacen que sea más recomendable la transferencia en estadios más tempranos (Maheshwari et al. 2016). Por lo tanto, son necesarios más estudios, preferentemente ensayos clínicos prospectivos y aleatorizados que aclaren la situación.

Objetivos

El objetivo general de esta tesis ha sido el de evaluar el potencial uso de PLA2G2A, UBQ y CD84 como biomarcadores diagnósticos o pronósticos de las TRA. Así como la valoración de su posible aplicación en el enriquecimiento de una población espermática en células con las moléculas de interés utilizando la técnica de MACS.

Objetivo 1. Evaluación de la presencia de las moléculas estudiadas en la membrana espermática.

- 1.1 Relacionar las tres moléculas estudiadas en los espermatozoides con los parámetros seminales, para ver su implicación en la calidad espermática.
- 1.2 Relacionar las tres moléculas estudiadas en los espermatozoides con la calidad de los embriones generados tras los tratamientos de ICSI, para determinar su potencial usos como marcador predictivo de estos parámetros o como biomarcadores de selección espermática.
- 1.3 Relacionar las tres moléculas estudiadas en los espermatozoides con el éxito reproductivo de los tratamientos: gestación, gestación clínica y gestación, para determinar sus posibles utilidades como biomarcadores predictivos del resultado de un tratamiento.

Objetivo 2. Evaluación de la eficiencia de la técnica de separación de espermatozoides mediante MACS, en función de dos de las moléculas de interés (UBQ y PLA2G2A). Con la intención de diseñar un protocolo que permita seleccionar los espermatozoides fisiológicamente competentes y que aplicado previo a los tratamientos de reproducción aumente las tasas de éxito.

Material y Métodos

7. Criterios de inclusión y exclusión

Todas las muestras seminales utilizadas en este estudio fueron muestras en fresco y todas ellas pertenecían a pacientes o donantes de las Clínicas IVI Valencia e IVI Bilbao.

Todos los pacientes y donantes que satisfacían los criterios de inclusión fueron informados previamente del fundamento de este estudio y se les solicitó su participación en él mediante la firma del consentimiento informado.

Las muestras cumplían distintos requerimientos según el objetivo para el que fueran a ser destinadas.

7.1 Objetivo 1

Las muestras incluidas en el estudio de este objetivo fueron pacientes que acudían a las clínicas IVI Bilbao o IVI Valencia para realizarse uno de estos tratamientos: IAH, ICSI con ovocitos donados o ICSI con ovocitos propios.

En este estudio no se han tenido en cuenta casos en los que el tratamiento fue la FIV convencional, ya que es una técnica muy minoritaria en los laboratorios de IVI Bilbao e IVI Valencia, por lo que se consideró que su inclusión en el estudio no era conveniente. Por ello, todas las referencias que se hagan en los apartados siguientes a tratamientos de FIV han de entenderse que son siempre de tipo ICSI.

En este proyecto se está estudiando el factor masculino, asociándolo con el éxito o fracaso de un tratamiento (gestación si/ gestación no) de modo que se debe controlar al máximo el factor femenino mediante los criterios de inclusión/exclusión, para que interfiera lo mínimo posible en los resultados del estudio.

Existen tantos factores que pueden causar esterilidad que es prácticamente imposible controlarlos todos. Por ello la selección de paciente ha de ser cuidadosa y en base a unos criterios de inclusión bien seleccionados, que permitan minimizar el efecto de otros factores sobre el resultado pero que no sean demasiado restrictivos. Ser demasiado exigentes con los criterios de inclusión puede dificultar la realización del estudio, ya que muy pocos pacientes cumplirían los requerimientos para participar y los resultados serían menos generalizables.

Por todo esto, a nuestro juicio, los criterios de inclusión han de ser variables muy influyentes en los resultados clínicos y que aparezcan con muy poca frecuencia, ya que de otro modo podría asumirse que se reparten equilibradamente entre los diferentes grupos.

Los requisitos para seleccionar las muestras dependerán de la TRA a la que se vaya a someter la pareja y se exponen a continuación:

IAH

Todas las muestras seminales pertenecían a varones cuyas parejas iban a someterse a una IAH ese mismo día. Estas muestras tenían una recuperación espermática en fresco superior a 3 millones de total de espermatozoides móviles progresivos tras el procesado de la muestra con la técnica de *swim-up*.

Las parejas de estos varones debían cumplir con las siguientes características:

- Edad inferior o igual a 38 años.
- No tener trompas obstruidas o cualquier otra alteración a nivel de las trompas de Falopio.
- No presentar malformaciones uterinas, ya sean, miomas, adenomiosis o malformaciones congénitas o adquiridas.

- Tener un índice de masa corporal menor de 30 kg/m^2 (obesidad).

ICSI con ovocitos propios

Los varones debían tener muestras de semen en fresco con un recuento de espermatozoides móviles progresivos superior a 1 millón, con la intención de evitar casos de factor masculino severo ligado a alteraciones genéticas y disponer de suficientes espermatozoides para los experimentos planteados. En cuanto al factor femenino debía cumplir con las siguientes características:

- Edad inferior o igual a 38 años.
- No presentar malformaciones uterinas, ya sean, miomas, adenomiosis o malformaciones congénitas o adquiridas.
- Ausencia de hidrosalpinx.
- No haber sufrido dos o más abortos previos (aborto de repetición).
- Tener un índice de masa corporal menor de 30 kg/m^2 (obesidad).

ICSI con ovocitos donantes

El criterio de inclusión para los varones fue el mismo que en el caso de ICSI con ovocitos propios. Sin embargo, los requerimientos para las mujeres fueron menos estrictos ya que únicamente se ha de controlar los factores que afectan al endometrio.

- Edad inferior o igual a 45 años
- No presentar malformaciones uterinas, ya sean, miomas, adenomiosis o malformaciones congénitas o adquiridas.
- Ausencia de hidrosalpinx.
- No haber sufrido dos o más abortos previos (aborto de repetición).
- Tener un índice de masa corporal menor de 30 kg/m^2 (obesidad).

En cuanto a los ovocitos procedían de donantes jóvenes (menores de 35 años) y sanas procedentes del programa de donación de ovocitos de IVI Valencia y Bilbao. Utilizando estos ovocitos, que se suponen de máxima calidad, se consigue una estandarización mucho mayor del factor femenino.

7.2 Objetivo 2

Las muestras seleccionadas para la evaluación de la separación de células en función de PLA2G2A y UBQ utilizando la técnica de MACS, procedían de:

- Pacientes que acudían a realizarse un espermiograma a la clínica IVI Valencia.
- Potenciales donantes de semen que traían su primera muestra al centro para la valoración de la calidad del semen. Esta es la primera prueba establecida en el protocolo de evaluación de varones interesados en ser donantes, para su admisión en el programa de donación de semen en la Clínica IVI Valencia.

En ambos casos si se cumplía el único requisito de recuperar tras *swim up* un total de más de 3 millones de espermatozoides móviles progresivos, se procedía a la inclusión del varón en el estudio.

Para el desarrollo de esta parte práctica del proyecto, en la cual se va a poner a punto una técnica de separación se ha considerado irrelevante el origen o la calidad de los espermatozoides, ya que se intenta desarrollar una técnica aplicable a todo tipo de muestra seminal.

8. Objetivo 1: Evaluación de la presencia de las moléculas estudiadas en la membrana espermática.

8.1 Tratamientos de IAH.

8.1.1 Estimulación y preparación de la paciente

Las pacientes que se sometieron a un ciclo de IAH fueron estimuladas con FSH usando Gonal-F (Serono S.A., Spain) o Puregon (Schering-Plough Española, Spain) o con gonadotropina menopáusica humana (HMG) mediante Lepori (FarmaLaboratories, Spain) o Menopur (Ferring, Spain). La estimulación con alguno de estos medicamentos se inicia en el día 3 de ciclo con una dosis de entre 75 y 150 UI/día. Una vez alcanzado el desarrollo folicular óptimo, el cual se va monitorizando por ecografía vaginal y con los niveles de estradiol en sangre, se desencadena la ovulación. Se considera un desarrollo folicular óptimo, cuando el diámetro del folículo dominante se encuentra entre 18-19 milímetros. La ovulación se desencadena provocando un pico de hormona luteinizante (LH) en la paciente, inducido por la hormona coriónica humana (HCG) con Profasi (Serono S.A., Spain). La ovulación ocurre alrededor de las 36 horas post-HCG, por lo que la paciente fue inseminada entre las 12 y 36 horas tras la inyección (Garrido et al. 2007).

8.1.2 Preparación de la muestra de semen e inseminación

Las muestras fueron recogidas por masturbación tras un periodo de abstinencia sexual de entre 2 y 7 días. Se recogieron en botes de policarbonato de boca ancha y fueron entregados en el laboratorio de andrología. Tras la licuefacción de la muestra a 37°C, 5% de CO₂, durante 30 minutos, se procedía a la evaluación de la calidad seminal (espermiograma).

Como ya se ha explicado en la introducción, el espermiograma consta de una evaluación macroscópica y una microscópica, esta última se realiza en una cámara Makler (SefiLaboratories, Tel Aviv, Israel) (Figura 11), este es un soporte que sirve para contar concentración y movilidad de los espermatozoides de una muestra por visualización en un microscopio de contraste de fases.



Figura 11 Cámara Makler.

Esta cámara consta de dos piezas de cristal que superpuestas crean un espacio donde una gota (10µl) de la muestra se reparte uniformemente permitiendo la movilidad de los espermatozoides. La pieza superior presenta una cuadrícula de 100 cuadrados de 0,1x0,1mm de lado, por lo tanto, el número de espermatozoides que hay en 10 cuadrados representará la concentración en millones por mililitro. Para una aproximación más exacta de la concentración se contaba el número de espermatozoides que había en 30 cuadrados y se calculaba la media.

En cuanto a la movilidad se evaluaba en esa misma gota, con ayuda de un contador de células. Por observación de 100 espermatozoides libres elegidos al azar, se calculaba el porcentaje que presenta movilidad progresiva, movilidad no progresiva e inmovilidad.

La morfología se evalúa sobre un portaobjetos, donde se realiza una extensión de la muestra, se deja secar al aire y se tiñe con Panóptico rápido. Las muestras se observaron en el microscopio óptico con el objetivo de 100x y aceite de inmersión. Con ayuda de un contador de células se registra la morfología de 200 espermatozoides y se calcula el porcentaje de anormales/normales y las anomalías.

El volumen total del eyaculado fue determinado con una pipeta graduada estéril.

Una vez evaluado el semen fue procesado mediante la técnica de **swim-up**. Esta es una sencilla técnica que se basa en la capacidad de “nado” de los espermatozoides hacia un medio más enriquecido. En primer lugar, la muestra fue colocada en un tubo Falcon (Becton Dickinson, USA) de fondo redondo y se preparaba una dilución 1:2 o 1:3 de la muestra seminal con Medio Sperm (Cook, Bloomington, IN, USA). Esta dilución fue centrifugada a 400g durante 10 minutos, tras la cual se eliminaba todo el sobrenadante. Sobre el sedimento o pellet se añadía un volumen dependiente del total de espermatozoides móviles progresivos de la muestra en fresco, este volumen varía de 0,5 a 1mL de Medio Sperm (Cook, Bloomington, IN, USA). La incorporación de este medio ha de ser cuidadosa para evitar que se levante el sedimento. Las muestras se dejaban en el incubador con una inclinación de 45º, a 37°C y 5% de CO₂, durante 45 minutos. Transcurrido ese tiempo, se recogían 0,5mL de la capa superior, donde se encuentran los “mejores” espermatozoides, los que tienen mayor capacidad de movimiento (Figura 12).

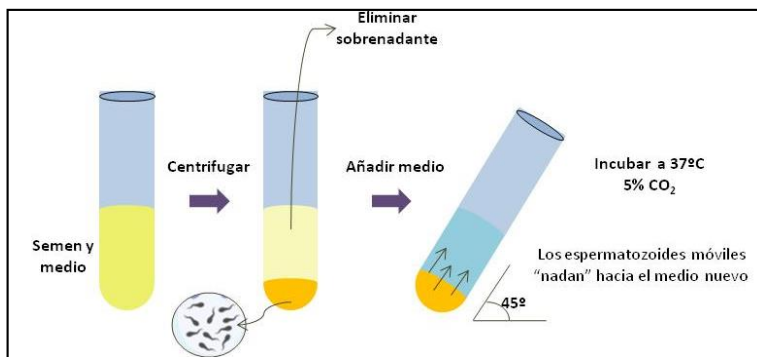


Figura 12 Esquema de la técnica de capacitación *swim up*.

En ese momento la muestra estaba lista para la inseminación de la paciente. Tras disponerla en una cánula de inseminación (Kitazato IUI Catheter soft type 180mm; Kitazato, Tokyo, Japan), se procedía a la introducción de la muestra capacitada en el útero de la paciente, vía vaginal.

8.1.3 Obtención del material para el estudio

Del volumen del sobrenadante, que quedaba tras recoger la parte que se utilizaba para el tratamiento y tras el recuento de espermatozoides capacitados, una alícuota de aproximadamente 100.000 espermatozoides se recogía, de la parte superior, para las determinaciones por citometría de flujo.

Esta alícuota se lavaba con Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Gibco 1X) (PBS) y el sedimento generado, fijado con paraformaldehído (PFA) (Merck, Madrid, Spain) al 4%, preservando de esta manera las características y morfología de los espermatozoides. Tras 20 minutos con el fijador a temperatura ambiente este se eliminaba, la muestra se lavaba y resuspendía posteriormente en PBS. Las muestras fijadas fueron conservadas a 4°C hasta su posterior análisis.

8.1.4 Valoración de la gestación

Alrededor de 15 días después del tratamiento se procedía a la valoración de la gestación mediante la determinación de los niveles séricos de la gonadotropina coriónica Beta (β -hCG). En los casos en los que la prueba resultaba positiva, una segunda evaluación es requerida, una semana después, mediante una ecografía transvaginal. Las ecografías y mediciones se repitieron semanalmente hasta la detección de latido cardíaco, considerándose entonces gestación clínica.

8.2 Tratamientos de FIV mediante ICSI

8.2.1 Protocolos de estimulación

8.2.1.1 Estimulación ovárica

Tanto las donantes, como las pacientes que iban a someterse a un tratamiento con sus propios ovocitos, fueron sometidas a un protocolo de estimulación ovárica basado en antagonistas de la GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas).

En este protocolo, previamente descrito en (Munoz et al. 2013), se administra, a partir de los días 2 y 3 de ciclo, dosis de 150-300UI/día de FSH recombinante (Gonal-F; Merck, Madrid, Spain, o Puregon; MSD, Madrid, Spain). Cuando el folículo dominante alcanza un diámetro de 14mm se administra una dosis de 0,25mg/día de antagonista de la GnRH (Cetrotide; Merck, Madrid, Spain) hasta el día de la inducción a la ovulación. Una única dosis de triptorelina 0,2mL (Decapeptyl; IpsenPharma, Barcelona, Spain) es administrada vía intramuscular para la maduración ovocitaria final, cuando al menos 3 folículos han alcanzado un diámetro medio mayor o igual a 18mm.

8.2.1.2 Preparación endometrial

El protocolo usado para la preparación endometrial de las receptoras del programa de donación de ovocitos ha sido anteriormente publicado (Remohi et al. 1995, Soares et al. 2005), y se realizó siguiendo las rutinas clínicas establecidas en los centros IVI.

Las pacientes con función ovárica activa se desensibilizan con una única administración intramuscular de triptorelina 3,75 mg depot (Decapeptyl 3,75 mg; IpsenPharma, Barcelona, Spain) administrada entre 18-21 días del ciclo previo. La sustitución de estrógenos se inicia en el día 3-5 del nuevo ciclo de menstruación,

después de confirmar la quiescencia ovárica y un determinado grosor endometrial mediante ecografía transvaginal.

Se administra (vía oral) valeraniato de estradiol (E2), la cantidad administrada es de 2 mg/día (Progynova; Schering, Madrid, Spain) durante los 8 primeros días, incrementándose a 4 mg/día durante los 3 días posteriores, finalmente se aumenta la dosis a 6 mg/día hasta el momento del test de embarazo. Únicamente el ciclo se cancela en casos de sangrado vaginal de la receptora durante la administración del valeraniato de E2. Cuando la paciente no presenta función ovárica, el tratamiento con estrógenos se inicia directamente.

Una vez comprobada la fecundación, las pacientes inician la administración de progesterona intravaginal micronizada (Progeffik; Effik Laboratories S.A., Madrid, Spain), con una dosis diaria de 800 mg/día, continuando con esta dosis al menos hasta el resultado del embarazo (Escriba et al. 2006). Cuando el test de embarazo es positivo, la administración de valerianato de E2 y de progesterona micronizada continua hasta 80 días después del test de embarazo.

8.2.2 Preparación de la muestra de semen

Las instrucciones para la recogida de las muestras de semen, en cuanto a metodología y abstinencia sexual y la evaluación de dicha muestra fueron siempre las mismas, independientemente de la TRA para la que fueran a ser preparadas (véase 2.1.2).

La mayoría de las muestras procesadas para esta TRA se procesaron mediante gradientes de densidad. Esta técnica se basa en la recuperación de los espermatozoides capaces de vencer la oposición que ofrecen un medio (Sperm Grad de Vitrolife, Sweden) con dos densidades diferentes y llegar al fondo del tubo.

En un tubo cónico de 10mL se añadía en primer lugar 1mL del medio de mayor densidad (90%), sobre este y con mucho cuidado de que no se mezclen ambas diluciones, se añadía otro mililitro del medio menos denso (45%). Una vez preparado el gradiente de densidad se depositaba cuidadosamente 1mL de la muestra de semen y se centrifugaba a 300g durante 12-13 minutos. Tras esta centrifugación los espermatozoides con mejor morfología y movilidad se depositan en el fondo formando un sedimento, el cual fue recogido con una pipeta Pasteur de vidrio estéril (Figura 13). A continuación, este sedimento recuperado se lavaba con Medio Gamete (Cook, Bloomington, IN, USA) y centrifugaba a 400g durante 10 minutos. Por último, se eliminaba el sobrenadante y el sedimento se resuspendía en 0,8-0,9 mL de Medio Fertilization (Cook, Bloomington, IN, USA), quedando la muestra lista para su utilización en el ICSI.

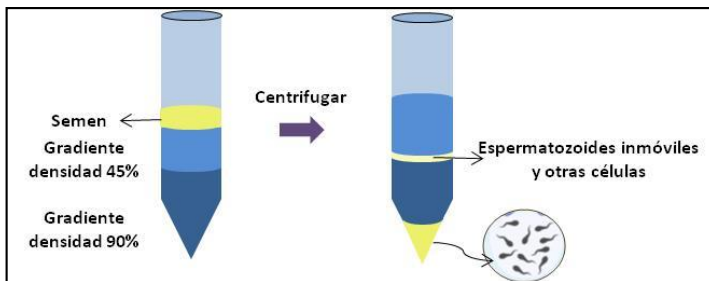


Figura 13 Esquema de la técnica de capacitación con gradientes de densidad.

8.2.3 Realización del ICSI

8.2.3.1 Obtención de los ovocitos

La extracción de los ovocitos del interior de los folículos, procedimiento conocido como punción folicular, se realiza a las 36 horas de la administración de la última inyección. Este es un procedimiento que se realiza bajo sedación, mediante una aguja especial que es ecográficamente guiada hasta los folículos. El contenido de

estos es aspirado, con el fin de recuperar los ovocitos que han crecido en su interior, y depositado en tubos estériles precalentados a 37°C.

La punción folicular se realiza en un quirófano anexo al laboratorio de FIV con tal de evitar una pérdida de la temperatura durante el traslado de los tubos con el líquido folicular del quirófano al laboratorio.

Una vez en el laboratorio el líquido folicular es inspeccionado a la lupa en placas *Petri* precalentadas, en busca de complejos cúmulo-corona-ovocito. Los complejos son recolectados y dispuestos en placas con medio tamponado (Medio Gamete (Cook, Bloomington, IN, USA)) donde con ayuda de dos agujas se elimina el exceso de granulosa o cualquier coágulo de sangre que puedan tener adheridos los complejos. Una vez libres de estos restos perjudiciales se pasan a una placa con Medio Fertilization (Cook, Bloomington, IN, USA) y se guardan en el incubador a 37°C y 5,5% de CO₂, durante aproximadamente 4 horas, hasta su uso.

8.2.3.2 Decumulación de los ovocitos

Transcurridas las 4 horas, tiempo necesario para que se complete la maduración de los ovocitos, se procede a la decumulación. La finalidad de esta técnica es eliminar las células del cúmulo y la corona que rodean al ovocito, permitiendo evaluar la madurez del mismo y llevar a cabo la microinyección del espermatozoide, que de otra manera se vería seriamente dificultada.

La decumulación se lleva a cabo por una doble acción:

- Acción enzimática. Los complejos cúmulo-corona-ovocito se depositan en gotas de Medio Fertilization (Cook, Bloomington, IN, USA) que contienen al 50 % la enzima hialuronidasa 40IU/mL (Sage IVF, Biocare Europa). Esta

enzima degrada el AH presente en la granulosa permitiendo la separación de estas células.

- Acción mecánica. Los complejos se pipetea varias veces con capilares cuyo calibre va disminuyendo, hecho que provoca la separación de las células que rodean al ovocito.

8.2.3.3 Microinyección de espermatozoides

Los ovocitos decumulados se disponen en una placa con gotas de Medio Gamete (Cook, Bloomington, IN, USA), en cada gota se colocan uno o dos ovocitos. En esa misma placa y en una gota con PVP (polivinilpirrolidona) (LIFE Global Group, USA) se depositan los espermatozoides capacitados.

La inyección del espermatozoide en el ovocito se realiza en un microscopio invertido con pletina calefactada que tiene acoplado un sistema de micromanipulación con dos pipetas. Se seleccionan los espermatozoides con mejor movilidad y morfología, estos son inmovilizados y activados con la pipeta de microinyección, que será con la que se introduzca el espermatozoide en el citoplasma del ovocito.

Por otro lado, el ovocito se sujeta con la otra pipeta, pipeta de sujeción, teniendo en cuenta la posición del CP para que al introducir la pipeta de microinyección en el ovocito no se altere el huso meiótico.

Se procede a la inyección, tras la cual los ovocitos se traspasan a una placa de incubación con Medio Cleavage (Cook, Bloomington, IN, USA), se dispone un ovocito por gota debidamente rotulada y estas placas se mantienen en el incubador

a 37°C y 5% de CO₂, hasta el momento de la valoración de la fecundación (Palermo et al. 1992).

8.2.3.4 Valoración de la fecundación

Cómo se ha indicado en la introducción, la evaluación de la fecundación se realiza a las 18 horas post-ICSI; mediante observación de los cigotos al microscopio invertido. Se considera fecundación correcta cuando se observan dos CP y dos PN, cualquier otra combinación (1CP:2PN, 1CP:3PN, 2CP:1PN, 2CP:3PN) se considera una fecundación anómala.

8.2.4 Obtención del material para el estudio

Del volumen de espermatozoides capacitados para el ICSI y tras tomar lo necesario para la realización del mismo, el excedente era recogido para el estudio.

Tras el recuento de los espermatozoides de la muestra, ésta se fijaba y preservaba de la misma manera que en el caso de las IAH (véase 2.1.3).

8.2.5 Valoración de la calidad embrionaria, transferencia y resultado.

De todos los embriones generados procedentes de ovocitos de la propia paciente la calidad fue evaluada según los criterios definidos por ASEBIR (ASEBIR. 2015).

Como se ha explicado en la introducción la morfología embrionaria se evalúa en día 2 y día 3 de desarrollo, teniendo en cuenta los siguientes aspectos: número de células, simetría, presencia de multinucleación y porcentaje de fragmentación.

La evaluación en día 5 y 6 se realiza en función de la morfología de la MCI y del TE, además de tener en cuenta el grado de desarrollo del blastocisto (BC, BE, BHi o BH). Debido a la complejidad para valorar la calidad de los blastocistos, en los que se tiene en cuenta tanto la MCI como el TE (ALPHA Scientists In Reproductive Medicine

and ESHRE Special Interest Group Embryology 2011), en este proyecto únicamente se tuvo en cuenta el estado de desarrollo de los embriones en su día 5 y 6, evaluando de esta manera el ritmo de evolución, que se ha descrito que también se relaciona con el potencial de esos embriones (Shoukir et al. 1998).

Según la calidad de los embriones se seleccionan aquellos que serán transferidos en el ciclo en fresco, los que son criopreservados para futuras transferencias de embriones y los que son descartados por no presentar calidad suficiente, no viables.

El/los embrión/es seleccionados para la transferencia son dispuestos en una placa de transferencia y mediante un cánula Kitazato ET Catheter (Kitazato BioPharma Co. Ltd, Fuji, Japan) los embriones son transferidos al útero materno de manera ecoguiada.

En cuanto a la valoración del resultado del tratamiento aplica la misma metodología que en el caso de las inseminaciones (véase 2.1.4).

8.2.6 Criopreservación de embriones.

En los casos en los que el número de embriones viables generados tras un ciclo de ICSI excede al número de embriones transferidos en fresco (en ese mismo ciclo), el destino de estos embriones supernumerarios es el de ser criopreservados para futuras transferencias.

Por otro lado, en los casos en los que la transferencia embrionaria en el propio ciclo de la estimulación es cancelada, todos los embriones de buena calidad son criopreservados. Aplazándose de esta manera la primera transferencia embrionaria a un ciclo posterior (transferencia en diferido).

Estos embriones destinados a la criopreservación fueron vitrificados con el protocolo y medios de Kitazato (Kitazato BioPharma Co. Ltd, Fuji, Japan) (Cobo et al. 2012). De manera resumida este protocolo sigue los siguientes pasos: los embriones se depositan en un primer pocillo con medio de equilibrio (ES) donde permanecen 13-15 minutos. A continuación, se pasan a un pocillo con medio de vitrificación (VS) durante un minuto se limpian bien de posibles restos de medio ES pasándolos por dos pocillos de esta solución (VS). En ese minuto se ha de colocar el o los embriones en la lengüeta de un Cryotop (Kitazato BioPharma Co. Ltd, Fuji, Japan), dejándolos sin apenas medio e inmediatamente se ha de sumergir en nitrógeno líquido.

Los Cryotops (Kitazato BioPharma Co. Ltd, Fuji, Japan) son encapuchados y guardados debidamente rotulados en tanques de vapores de nitrógeno donde son conservados a -196°C hasta su futura desvitrificación.

8.3 Tráferencia de embriones congelados

8.3.1 Preparación endometrial

El protocolo de terapia hormonal para la preparación endometrial de mujeres que van a someterse a una transferencia de embriones criopreservados es muy similar a la preparación endometrial de las receptoras del programa de donación de ovocitos (Remohi et al. 1995, Soares et al. 2005), con alguna peculiaridad que señalaremos a continuación.

Tras 10 días de terapia estrogénica se procede a la comprobación de los niveles de estradiol en sangre (superiores a 100pg/mL), el nivel de progesterona (inferior a 1ng/mL) y el patrón endometrial (trilaminar con un espesor superior a 7mm). En ese momento se procede al inicio de la administración de progesterona micronizada vía vaginal (Progeffik; Effik Laboratories S.A., Madrid, Spain). La

transferencia de embriones, tras su desvitrificación, es pautada tantos días después del inicio de la administración de la progesterona, como días de desarrollo tengan los embriones a transferir (Coello et al. 2017).

8.3.2 Desvitrificación de los embriones y transferencia

El proceso de desvitrificación de los embriones también siguió el protocolo indicado por la casa comercial (Kitazato BioPharma Co. Ltd, Fuji, Japan) (Cobo et al. 2012, Coello et al. 2017). A grandes rasgos consiste en: una vez sacado el/los Cryotops (Kitazato BioPharma Co. Ltd, Fuji, Japan) del tanque siempre sin perder temperatura, se sacan del tanque sumergidos en nitrógeno líquido, la lengüeta del Cryotop (Kitazato BioPharma Co. Ltd, Fuji, Japan) es sumergida en medio de descongelación (TS) a 37°C. A continuación, se pasa a una solución diluyente (DS) durante tres minutos y por último se lava en dos pocillos con medio de lavado (WS). Una vez pasado el tiempo estipulado por el protocolo (5+1minutos en los pocillos con WS) los embriones son depositados en medio de transferencia (Blastocyst Medium; Cook, Bloomington, IN, USA), desde el cual serán transferidos al útero de la paciente.

8.3.3 Valoración del resultado del tratamiento

Los resultados se evaluaron igual que en los tratamientos anteriores (véase 2.1.4).

8.4 **Citometría de Flujo**

La citometría de flujo es una técnica rápida, sencilla y objetiva que permite el análisis de células en suspensión. El principio en el que se basa es simple; hacer pasar las células alineadas y de una en una por delante de un haz de luz. La dispersión de la luz es analizada y transformada en información acerca del tamaño,

la forma y la complejidad del evento que pasa por delante del haz de luz (Figura 14).

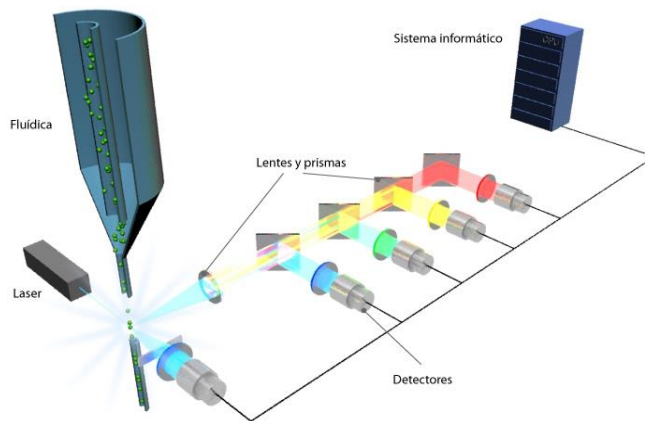


Figura 14 Esquema del funcionamiento de un citómetro de flujo.

Por otro lado, y abriendo un amplio abanico de posibilidades, la citometría de flujo permite la utilización de fluorocromos para marcar determinadas características de interés. Los fluorocromos son moléculas que al ser excitadas por un haz de luz de determinada longitud de onda emiten la energía en una longitud de onda mayor. Existen múltiples fluorocromos cada uno emite en una longitud de onda conocida, lo que permite una gran cantidad de combinaciones y de determinaciones al mismo tiempo.

La manera más común de utilizar los fluorocromos en citometría es uniéndolo a un anticuerpo específico para una determinada molécula de interés (antígeno) que se encuentra en la célula, ya sea exteriormente, en el citoplasma o incluso en el interior del núcleo.

Debido a las características del citómetro de flujo, a la variedad de fluorocromos y a especificidad antígeno-anticuerpo, se puede distinguir múltiples características células al mismo tiempo en una misma población celular.

Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por un software informático.

El análisis de los datos recogidos permite identificar una población concreta de células dentro de un conjunto de diferentes tipos celulares gracias al análisis de la dispersión de la luz y mediante el análisis de la luz emitida por los fluorocromos se puede determinar la presencia o ausencia de un determinado marcador, así como, la proporción de células que lo presentan e incluso la cantidad de marcador en cada célula.

8.4.1 Preparación de la muestra para análisis

Cada una de las muestras fijadas y conservadas a 4°C se dividió en dos fracciones alícuotas; una de las cuales que llamaremos “control” no fue expuesta al anticuerpo primario diseñado para identificar las proteínas de interés (PLA2G2A, CD84 o UBQ) para de esta manera estandarizar todas las muestras analizadas en diferentes días.

A la fracción alícuota destinada a la identificación del porcentaje de células positivas para cada una de las moléculas, que llamaremos “muestra”, se le añadieron las diluciones de los anticuerpos seleccionados para la identificación de las distintas moléculas (Tabla 8). Las muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se eliminó el exceso de anticuerpo primario mediante una centrifugación a 800g durante 10 minutos, se lavaron las muestras con PBS y se incubaron, durante 10 minutos a 4°C y en oscuridad, con un anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo (Tabla 8). Una vez pasado ese tiempo, se eliminó nuevamente el exceso de anticuerpo con una centrifugación de 800g durante 10 minutos y se resuspendió en 500µl de PBS para su análisis en el citómetro.

La fracción alícuota control también fue sometida a la incubación con el anticuerpo secundario y al posterior lavado.

	PLA2G2A	CD84	UBQ
Anticuerpo primario (1^{ario})	Anti-PLA2G2A / SPLA2 Antibody IHC-plus	CD84/SLAMF5 Antibody	Anti-Ubiquitin mAb
Hospedador 1^{ario}	Ratón	Ratón	Ratón
Dilución del 1^{ario}	1:100	1:100	1:100
Referencia 1^{ario}	LifeSpan BioSciences, Inc. LS-B1614	Novus Biological NB100-65929	Kamiya Biomedical MC-033
Anticuerpo secundario (2^{ario})	Anti-IgG1-FITC mouse	Anti-IgG1-FITC mouse	Anti-IgM-FITC mouse
Hospedador 2^{ario}	Rata	Rata	Rata
Dilución del 2^{ario}	1:10	1:10	1:10
Referencia 2^{ario}	Miltenyi Biotec 130-095-897	Miltenyi Biotec 130-095-897	Miltenyi Biotec 130-095-906

Tabla 8 Información de los anticuerpos utilizados para la citometría de flujo.

8.4.2 Análisis por citometría de flujo y análisis de los datos

Las muestras fueron procesadas usando Cytomics FC500 (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA) equipado con 2 láseres, 5 canales de fluorescencia y 2 detectores para la dispersión de luz, uno para la dispersión frontal (*forward scatter*, FS) y otro para la dispersión lateral (*side scatter*, SS). Para la detección de los espermatozoides se utilizaron los detectores de FS y SS. La población de espermatozoides fue seleccionada en el histograma biparamétrico (FS log/SS log) seleccionándolos de esta manera por tamaño y complejidad, y eliminando las células no espermáticas y restos celulares presentes también en las muestras (Figura 15).

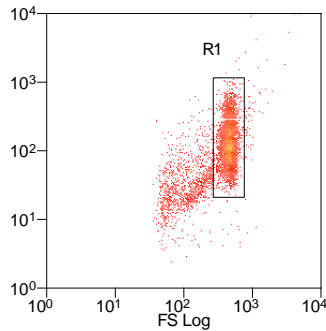


Figura 15 Histograma biparamétrico de citometría de flujo, donde se muestra la población de espermatozoides seleccionada en el recuadro R1.

Esta selección se aplicó a los histogramas donde se detectó la fluorescencia debida al anticuerpo secundario. Esta fluorescencia fue detectada por el canal de fluorescencia de 525 nm (fluorescencia verde), longitud de onda en la que emite el fluorocromo utilizado (isocianato de fluoresceína-FITC-).

Fueron analizados al menos 5.000 espermatozoides (eventos dentro de la selección del histograma FS log/SS log) por cada muestra. Además, el hecho de realizar un control de cada muestra permitió eliminar la posible autofluorescencia causada por los propios espermatozoides.

Los gráficos de fluorescencia se analizaron mediante el software Summit v4.3.

Los resultados registrados fueron el porcentaje de espermatozoides que presentaban el marcador objeto de estudio y la mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada (nMIF) para cada una de las moléculas, es decir, el valor de fluorescencia en el cual la mitad de las células están marcadas débilmente y la otra mitad intensamente (Sutovsky et al. 2001b). La comparación de este parámetro entre diferentes muestras da idea de la cantidad media de marcaje (molécula) por célula, puesto que un mayor nMIF quiere decir que la intensidad de fluorescencia a la cual el 50% de los espermatozoides están marcados

intensamente y el otro 50% débilmente, es mayor, lo que se explica por un aumento en la cantidad de fluorocromo en los espermatozoides, es por lo tanto una medida relativa de la cantidad de molécula por célula.

El valor de la mediana de intensidad (MIF) se registró de cada muestra y de su control para establecer un cociente: muestra/control que pudiera hacer comparables datos analizados en diferentes días, con la intención de controlar las variables que pudiera desviar el resultado real. Dicho cociente da como resultado el valor que se registró para cada molécula como nMIF (Chan et al. 2013, Tomiyama et al. 2004).

8.5 Variables en estudio

De acuerdo con los objetivos del estudio, se realizan dos aproximaciones. En la primera de ellas se busca la relación entre el nivel de expresión de cada una de las proteínas analizadas (PLA2G2A, CD84 y UBIQ) en la muestra de espermatozoides y la calidad de la muestra seminal en fresco.

Las variables por lo tanto serán:

- Nivel de expresión de las proteínas medido por citometría de flujo. Esta determinación consiste en dos aspectos que se tienen en cuenta; el **porcentaje de células marcadas** y la **mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada**.
- La calidad de las muestras de semen en fresco determinada por la **concentración, el volumen y la movilidad** (progresivos, no progresivos e inmóviles).

- La calidad de las muestras de semen tras el proceso de capacitación; definida con las variables de **concentración y movilidad** (progresivos, no progresivos e inmóvil).

En segundo lugar y en el único caso de los tratamientos de ICSI, se relacionan los niveles de expresión de cada una de las proteínas con la calidad de los embriones generados en el tratamiento con las muestras de semen estudiadas. Las variables tenidas en cuenta para evaluar la calidad embrionaria son las que se muestran a continuación;

- **Tasa de viabilidad embrionaria.** Esta variable se define como la cantidad de embriones viables con respecto a los no viables de una cohorte embrionaria. Se han considerado embriones viables aquellos que presentan calidad suficiente para ser transferidos o criopreservados para futuras transferencias. Aquellos que son descartados por no alcanzar el estadio correspondiente a cada momento del desarrollo con calidad suficiente, por bloquearse o degenerar, son los embriones no viables.
- **Número de células en día 3 de desarrollo embrionario.** Teniendo en cuenta que los embriones con 7 u 8 células en día 3 de su desarrollo son los que se consideran con mayor potencial de implantación (ASEBIR. 2015), en el presente estudio se han definido tres grupos de embriones en función del número de células que presentaban en el momento de su evaluación en día 3 de desarrollo. Estos grupos son: 1) embriones con menos de 7 células; 2) embriones con 7 u 8 células y 3) embriones con más de 8 células.
- **Tasa de fragmentación en día 3 de desarrollo embrionario.** El grupo de expertos de ASEBIR establece 4 puntos de corte en el porcentaje del embrión que se encuentra fragmentado (ASEBIR. 2015):

- ≤ 10%: Embriones con mayor tasa de implantación.
- >10-25%: Embriones en los que la implantación no se ve comprometida.
- >25-35%: Embriones con un descenso en su potencial implantatorio.
- >35%: Embriones con implantación comprometida (>50% implantación prácticamente nula)

Sin embargo, en el presente estudio, se han establecido otros puntos de corte. Debido a que en nuestros datos existen una gran cantidad de embriones nada fragmentados (0% de fragmentación) y una gran acumulación de embriones con 5-15% de fragmentación, los puntos de corte corresponden a los cuartiles de los datos eliminando los ceros.

- **Simetría en día 3 de desarrollo embrionario.** Se valora la simetría por comparación de tamaño entre las células del embrión y se asigna a una de las siguiente cuatro categorías: 1(igual tamaño celular), 2(tamaño celular similar), 3(tamaño celular desigual) (ASEBIR. 2015).
- **Estadio de desarrollo de los blastocistos en día 5 de desarrollo.**
- **Estadio de desarrollo de los blastocistos en día 6 de desarrollo.** El grado de desarrollo de un embrión en las fases avanzadas del cultivo (tanto en día 5 como en día 6) se ha clasificado en las siguientes fases: embrión no evolutivo (NoE), mórula compacta (MC), BT, BC, BE, BHi y BH.

En la tercera y última aproximación, se estudia una posible relación entre los niveles de expresión de estas proteínas (medido como se indica anteriormente) en las muestras capacitadas de espermatozoides y el resultado de los tratamientos para

los cuales se han utilizado estas muestras (IA e ICSI). Dichos resultados se miden con las siguientes variables:

- **Gestación.** Entre 14 y 16 días después de la fecundación se valoran los niveles séricos de la β -hCG, si el resultado es mayor de 10UI/L la gestación bioquímica se considera positiva.
- **Gestación clínica.** Cuando la prueba sea positiva, una segunda medición seguida de una ecografía transvaginal se realizará una semana después (21-23 días después de la fecundación). Las ecografías y mediciones se repiten semanalmente hasta la detección de latido cardíaco, considerándose entonces la gestación clínica.
- **Gestación evolutiva.** La confirmación de la evolución de la gestación se realiza en semana 12, mediante una ecografía de control donde se evalúa el correcto desarrollo del feto.

8.6 Análisis estadísticos

En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo de los datos para evaluar el comportamiento general de los mismos (media, error estándar, mediana, etc.). La determinación del tipo de distribución que seguían estos datos se realizó mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Las comparaciones de distribución entre dos grupos se realizaron mediante la prueba de comparación de grupos no paramétrica Kruskal-Wallis (puesto que no se podía considerar que la distribución de los grupos fuera normal).

Para medir la relación entre dos variables cuantitativas (presencia de las moléculas y parámetros seminales) se utilizaron pruebas de correlación de Pearson.

Para el análisis de la evaluación del desarrollo embrionario se aplicó un modelo mixto de efectos acumulados (CLMM; del inglés: *cummulative link mixed model*) para cada una de las variables definidas. En estos modelos se controla el efecto intra-grupo de cada cohorte embrionaria, es decir, se tiene en cuenta que todos los embriones de una paciente no son independientes entre sí, sino que pertenecen a una misma cohorte de embriones.

Para comparar los valores de los biomarcadores según el resultado gestacional (en los ciclos en fresco) de las TRA (gestación si/no), se aplicó la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Sin embargo, en la evaluación de los resultados gestacionales acumulados (ciclos en fresco y en diferido) se definió un modelo de Poisson para cada una de las variables de gestación. Este modelo permite correlacionar el valor de la proteína con el número de gestaciones acumuladas ajustado por el número de transferencias acumuladas de cada paciente.

El análisis estadístico se realizó bajo el lenguaje de computación estadístico R (versión 3.4.2).

9. Objetivo 2: Evaluación de la eficiencia de la separación de espermatozoides mediante MACS, en función de UBQ y PLA2G2A.

9.1 Reclutamiento de pacientes y procesamiento de las muestras

En el momento en el que los pacientes o donantes que acudían al laboratorio de andrología de IVI Valencia para entregar su muestra, eran informados del estudio y preguntados por su interés en la participación en el mismo. En el caso en que aceptaban y por tanto firmaban el consentimiento de participación en el estudio y si cumplían con los criterios de inclusión estos pacientes eran incluidos en el estudio.

Tras la evaluación de la muestra por parte del personal de laboratorio, esta muestra fue capacitada mediante la técnica del *swim up* (previamente detallada). La concentración del capacitado fue evaluada en la cámara Makler con tal de valorar el cumplimiento del único requisito de inclusión (más 3 millones de espermatozoides móviles). Cuando se cumplía este requisito se procedía inmediatamente a la aplicación del protocolo de separación.

9.2 Aplicación del protocolo de MACS

No existen en el mercado anticuerpos conjugados con una micropartícula magnética que reconozca a las moléculas de interés de este estudio (PLA2G2A y UBQ). Por lo tanto, se tuvo que recurrir a una reacción indirecta, es decir, se utilizaron anticuerpos que reconocen una de nuestras moléculas (anticuerpo primario) y otro anticuerpo conjugado con la micropartícula magnética que reconoce la fracción constante del anticuerpo primario (anticuerpo secundario).

Un total de 16 muestras fueron destinadas a la separación en base a la expresión en su membrana de UBQ y otras 16 muestras fueron separadas en función de PLA2G2A. El procedimiento para llevar a cabo la separación en ambos casos fue muy similar con los únicos puntos discordantes en los anticuerpos utilizados y las condiciones de incubación. El protocolo que se llevó a cabo se explica a continuación.

La muestra capacitada fue incubada con 100µl del anticuerpo primario según las condiciones recogidas en la Tabla 8 (los anticuerpos primarios y sus condiciones de incubación fueron las mismas que en la detección por citometría de flujo-véase 2.4.1-). Una vez pasado el tiempo de incubación el exceso de anticuerpo fue eliminado mediante un lavado con PBS, la muestra fue centrifugada durante 10 minutos a 400g, tras lo cual se retiró el sobrenadante. A continuación, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario según las especificaciones de la casa comercial y que se recogen en la Tabla 9. Un nuevo lavado se llevó a cabo esta vez con Medio Sperm (Cook, Bloomington, IN, USA), tras retirar el sobrenadante se diluyó el sedimento en 500µl de Medio Sperm (Cook, Bloomington, IN, USA).

Molécula	Secundario	Volumen	Condiciones de incubación
PLA2G2A	Anti-mouse IgG1 MicroBeads 130-047-101	20µl	15 minutos a 4°C
UBQ	Anti-mouse IgM MicroBeads 130-047-301	20 µl	15 minutos a 4°C

Tabla 9 Condiciones de utilización de los anticuerpos ²arios usados para la separación mediante MACS.

Por otro lado, la columna de separación compuesta por esferas de hierro y sujeta a un imán (MiniMACS; MiltenyiBiotec) fue enjuagada haciendo pasar por ella 500µl de Medio Sperm (Cook, Bloomington, IN, USA). Cuando este volumen había eluido la columna estaba lista para ser utilizada. En ese momento, la suspensión de semen con sus anticuerpos unidos fue introducida en la columna, la fracción que contiene los espermatozoides con la molécula en su membrana deberá quedar retenida en la columna de separación, se le denomina fracción positiva. Los espermatozoides

que no están unidos a las partículas magnéticas eluyen a través de la columna, estos forman la fracción negativa. Esta fracción fue recogida en un tubo Falcon (Becton Dickinson, USA) debidamente rotulado (Figura 16).

A continuación para recoger de la columna la fracción que se ha quedado adherida a ella, la columna fue retirada del imán, se añadió medio y con ayuda de la presión que ejercida con un émbolo, se recuperó en otro tubo la fracción positiva o espermatozoides con la molécula.

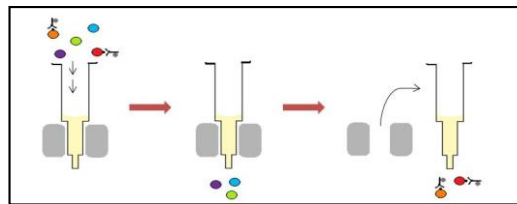


Figura 16 Esquema de la técnica de MACS.

Por último, las muestras fueron centrifugadas 10 minutos a 400g, se retiró todo el sobrenadante y el sedimento fue congelado por inmersión en nitrógeno líquido. Las muestras fueron conservadas a -20°C , hasta la comprobación de la técnica mediante una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

9.3 RT-PCR

El estudio de la eficacia de la técnica de MACS se decidió realizar a través de estudio de los transcritos de las moléculas de interés en cada una de las fracciones, ya que otras técnicas de detección de proteínas fueron descartadas por diferentes motivos que se explican más adelante.

La técnica utilizada para el estudio de los transcritos fue RT-PCR. Esta es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en ella una cadena de

ARN es retrotranscrita a ADN complementario (ADNc) gracias a la enzima transcriptasa inversa.

El fragmento de interés es amplificado gracias al diseño específico de los cebadores, mediante una PCR a tiempo real o cuantitativa (qPCR). El nivel de expresión del fragmento se detecta por la emisión de fluorescencia de agentes intercalantes (*SYBER Green*) que emiten su haz de luz cuando se encuentran entre las dos hebras que forman el ADNc y el sintetizado en la PCR. Esta fluorescencia que es directamente proporcional al incremento de ADN sintetizado en cada ciclo es detectada y medida por los lectores de fluorescencia de los que disponen los equipos de qPCR.

Debido a la pequeña cantidad de ARNm que contienen los espermatozoides nos vimos obligados a hacer agrupaciones (pooles) de muestras para disponer de una mayor cantidad de espermatozoides y por lo tanto mayor cantidad de ARN que permitiera la realización de esta técnica.

Los pooles fueron conjuntos de 4 separaciones, es decir, 4 muestras separadas por MACS dieron como resultado 4 fracciones positivas y 4 fracciones negativas. Las cuatro fracciones positivas se agruparon entre sí dando lugar al pool “nº1 positivo” y las 4 fracciones negativas al pool “nº1 negativo”. Se realizaron un total de 16 separaciones en función de PLA2G2A y otras 16 separaciones en función de UBQ, por lo tanto, tuvimos 4 parejas de pooles para cada una de las moléculas. La comparación de la expresión de la molécula de interés fue realizada entre la fracción negativa y la positiva de un mismo pool.

9.3.1 Extracción y cuantificación del ARN

Para la extracción del ARN de las muestras conservadas a -20°C, se resuspendieron en 1mL de Trizol los 4 sedimentos que iban a formar cada pool en una campana

extractora de flujo laminar vertical. A continuación, se añadieron 200 μl de cloroformo (relación 1:5 respecto al volumen inicial de Trizol) se agitó fuertemente la mezcla con ayuda de un vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 3-4 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugó durante 15 minutos a 12000g y 4°C. Se generan dos fases, de las cuales se tomó cuidadosamente la parte superior y en un nuevo tubo se mezcló con 500 μl de isopropanol (relación 1:2 respecto al volumen de Trizol utilizado). Tras unos 10-15 minutos de incubación, la mezcla se centrifugó nuevamente durante 15 minutos a 12000g y 4°C. El sobrenadante fue eliminado por decantación y se añadió sobre el sedimento 1mL de etanol al 70%. A continuación, se centrifugó a 7500g durante 5 minutos y a 4°C, el sobrenadante fue eliminado de nuevo por decantación y se resuspendió el sedimento en 14 μl de agua-DEPC (dietilpolicarbonato).

La cuantificación del ARN obtenido se realizó con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) (Figura 17) que es un potente espectrofotómetro basado en el pipeteo de pequeños volúmenes (1,5 μl) directamente sobre un pedestal plano donde se encuentra el extremo de una fibra óptica. NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) usa la tecnología de la fibra óptica y la tensión superficial, las muestras son depositadas entre dos superficies ópticas formando de esta manera un puente líquido entre ambas por tensión superficial. Es capaz de medir concentraciones desde 0,2ng/ μl hasta 3700ng/ μl .



Figura 17 NanoDrop 2000

La concentración de ARN se obtiene midiendo la absorbancia a 260nm y la calidad o pureza se determina con el valor de la ratio de las absorbancias a 260nm y 280nm. Los ácidos nucleicos absorben la luz ultravioleta con un pico de absorción a 260nm. Dentro del espectrofotómetro, la muestra se expone a una luz ultravioleta a 260nm y el fotodetector mide la luz que pasa a través de la muestra. Cuanta más luz sea absorbida mayor será la concentración de ácidos nucleicos. Es muy común que los ácidos nucleicos se encuentren contaminados por otras moléculas como proteínas, fenoles u otros compuestos orgánicos. Estas moléculas tienen otros picos de absorción, en concreto las proteínas que son la contaminación más frecuente, absorben a 280nm. Por esta razón, la muestra se expone también a un haz de luz a 280nm y por comparación de las absorbancias a ambas longitudes de onda se puede saber el nivel de contaminación con proteínas que tiene la muestra (A_{260}/A_{280}). Esta ratio deberá situarse entre 1,8 y 2,1.

9.3.2 Retrotranscripción

La síntesis de la cadena de ADNc se realizó partiendo de 1µg de ARN de cada una de las fracciones de cada uno de los pools. El protocolo llevado a cabo es el genérico que se detalla a continuación: el microgramo se lleva hasta un volumen de 12,5 µl añadiendo agua-DEPC (dependiendo de la concentración de ARN en cada muestra podremos un volumen diferente y por tanto el volumen de agua a añadir también será variable). A continuación, se añade 1 µl de cebador oligodT y se incuba durante 2 minutos a 70°C. Simultáneamente, se prepara una mezcla con los reactivos del kit *Advantage RT for PCR kit* (Clontech), compuesta por un búfer de reacción (4µl/muestra), desoxirribonucleótidostrifosfato (dNTPs) (1µl/muestra), inhibidor de la ARNasa recombinante (0,5µl/muestra) y la transcriptasa reversa MMLV (MoloneyMurineLeukemia Virus) (1µl/muestra). De esta mezcla se añade 6,5µl a cada muestra y tras homogeneizar bien el contenido se introduce en el termociclador (*GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems*). Se establece un

programa que mantiene las muestras durante 60 minutos a 42°C y posteriormente sube a 94°C donde permanece 5 minutos.

Una vez ha concluido la reacción, el contenido de los tubos fue diluido en 80µl de agua libre de ARNasas.

9.4 Reacción en cadena de la polimerasa

El ADNc resultante de la reacción de RT se utilizó como molde para su amplificación por PCR. Para la realización de la PCR cuantitativa cada reacción contenía 2 µl de la respectiva dilución de ADNc y 8 µl de *ADN Master SYBR Green I mix* (ROCHE). Esta mezcla contenía por cada una de las reacciones que se iban a llevar a cabo: 1µl de cebadores a 10µM (0,5µl de cada uno de los cebadores *-forward y reverse-*), 1µl de MgCl₂, 5µl de agua-DEPC y 1µl de SYBR Green. Cada muestra analizada se midió por duplicado. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un equipo *LightCycler* (Roche Dagnostics). El programa de amplificación consistía en un ciclo a 95°C (“hotstart”), seguido de 45 ciclos a 95°C (10 segundos), 60°C (8 segundos) y 72°C (9 segundos). La amplificación era seguida de un análisis de las curvas de *melting* usando el programa de un solo ciclo a 95°C (2 segundos), 55°C (10 segundos) y 95°C.

Para todos los experimentos de PCR se puso un control negativo sin ADNc molde. Además, se utilizó la β-actina como gene *housekeeping* o constitutivo.

En cuanto al diseño de los cebadores específicos para cada uno de los genes (PLA2G2A y UBQ) se utilizó el software Primer 3. Para ello, en primer lugar, se obtuvo la secuencia de nucleótidos del gen en la base de datos GENE de NCBI (*National Center for Biotechnology in information*). Esta secuencia fue introducida en el software *Primer 3*, así como las condiciones de diseño: la longitud del cebador debía estar entre 19 y 21 pares de bases (pb), con una temperatura de

fusión/*melting* (tm) de entre 59 y 61°C. Una vez seleccionados los cebadores, se comprobó su especificidad buscando homologías del amplicón en otros genes humanos utilizando BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los cebadores utilizados son detallados en la Tabla 10.

Gen	Secuencia de los cebadores (5' a 3')
PLA2G2A	FW TGA CGA CAG GAA AGG AAG CC
	RV CTG CTC CCC GAG TTG CTA AA
UBQ	FW AAG GCA TCC CTC CCG
	RV TAA CAG CCA CCC CTC AGG C
β -actina	FW GGC ACC CAG CAC AAT GAA G
	RV CCG ATC CAC ACG GAG TAC TTG

Tabla 10 Secuencia de los cebadores utilizados para la RT-PCR. FW: cebador sentido (del inglés: *forward*) y RV: cebador reverso (del inglés: *reverse*).

Los cebadores fueron suministrados por la casa comercial *Invitrogen*, los cuales llegaban al laboratorio, liofilizados y en viales de plástico. De acuerdo a las especificaciones del fabricante la concentración era del orden de Mol/l, por lo que se diluyeron en agua-DEPC para llevarlos a 100 μ M previamente a su utilización.

9.5 Comparación de la expresión génica entre fracciones

Para esta comprobación se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Este es un método matemático ampliamente utilizado para la cuantificación de cambios relativos en la expresión de un gen.

El Ct o ciclo umbral es el ciclo de PCR en el cual se alcanza el umbral de fluorescencia, es decir, el número de ciclo al cual la intensidad de emisión del fluorocromo aumenta con respecto al ruido de fondo. El valor de Ct es inversamente proporcional al número de copias del gen estudiado, de esta manera cuanto menor sea un Ct, menos ciclos son necesarios para alcanzar el umbral de fluorescencia y por lo tanto mayor será la expresión del gen en estudio.

Se considera que un valor de Ct superior a 40 indica que no hay amplificación y por lo tanto no hay expresión del gen en esas determinadas condiciones.

Los valores de Ct obtenidos para un gen diana son normalizados con los niveles de Ct de un gen calibrador (suele ser el mismo gen diana en condiciones de tratamiento control). Además, estos valores son corregidos por los valores de Ct de un gen endógeno (*housekeeping gene*).

$$\Delta Ct = Ct(\text{gen diana}) - Ct(\text{gen calibrador}) \rightarrow \Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct(\text{housekeeping gene})$$

No pasaremos a detallar las derivaciones matemáticas por las cuales se llega a la ecuación final que da nombre al método: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, se encuentran pormenorizadas en Livak and Schmittgen (2001) (Livak and Schmittgen 2001). Sin embargo, se ha de tener en cuenta que la interpretación del resultado es la tasa de cambio o *fold change* de la expresión de un gen en dos condiciones distintas.

En el caso particular de nuestro estudio, queremos comprobar la capacidad para enriquecer una muestra de espermatozoides en células con mayor expresión de un determinado gen. Explicado de otro modo, queremos valorar cuantas veces (*fold change*) más ARNm del gen de interés (mayor expresión) hay en la fracción positiva que, en la fracción negativa, tras la separación de los espermatozoides mediante la técnica de MACS.

Los términos de la ecuación fueron los siguientes dependiendo en función de qué molécula estemos separando los espermatozoides:

- En el caso de PLA2G2A:

Gen diana: PLA2G2A en la fracción positiva

Gen control o calibrador: PLA2G2A en la fracción negativa

Gen endógeno o *housekeeping gene*: β -actina

- En el caso de UBQ:

Gen diana: UBQ en la fracción positiva

Gen control o calibrador: UBQ en la fracción negativa

Gen endógeno o *housekeeping gene*: β -actina

Por lo tanto la ecuación final aplicada en función de la cual se determinó la capacidad para separar en función de cada una de las moléculas por la técnica de MACS, es la que sigue:

$$\frac{2^{-[(\text{Ct PLA2G2A o UBQ Fracción positiva}) - (\text{Ct PLA2G2A o UBQ Fracción negativa})]}}{2^{-[(\text{Ct } \beta\text{-actina Fracción positiva}) - (\text{Ct } \beta\text{-actina Fracción negativa})]}}$$

9.6 Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de los datos para evaluar su comportamiento general (media, error estándar, mediana, etc.). La determinación del tipo de distribución que seguían estos datos se realizó mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

Puesto que la distribución de los datos resultó normal en todos los casos, se realizó un test t student para muestras apareadas para comprar las medias de las fracciones positivas y negativas tras la separación espermática con MACS.

El análisis estadístico se realizó bajo el lenguaje de computación estadístico R (versión 3.4.2).

Resultados

10. Descripción de la expresión proteica de CD84, PLA2G2A y UBQ.

Para la determinación de la presencia de CD84, PLA2G2A y UBQ mediante citometría de flujo, se utilizaron un total de 237 muestras seminales de varones que acudieron a las clínicas IVI Bilbao o IVI Valencia para someterse a una TRA, ya fuera IAH o FIV (tipo ICSI) con ovocitos propios o donados. Concretamente se analizaron 50 muestras en el caso de CD84, 131 en el caso de PLA2G2A y 120 para UBQ. En un total de 64 muestras se analizaron dos moléculas distintas.

En la Tabla 11 que se presenta a continuación se recogen los datos descriptivos generales para cada una de las tres moléculas estudiadas.

La especificidad de los anticuerpos primarios se determinó omitiendo el anticuerpo primario antes de la adición del secundario y se utilizó para estandarizar los valores de análisis de días diferentes (Figura 18).

CD84		UBQ		PLA2G2A		
	% spz	nMIF	% spz	nMIF	% spz	nMIF
IA	0.00811 +- 0.0221	0.893 +- 0.081	0.71 +- 0.253	4.75 +- 3.27	0.204 +- 0.257	1.59 +- 1.45
FIV-PROPIOS	0.0691 +- 0.102	1.06 +- 0.587	0.784 +- 0.209	6.68 +- 4.54	0.102 +- 0.162	1.07 +- 0.309
FIV-OVODON	0.0431 +- 0.105	1.01 +- 0.594	0.858 +- 0.0902	6.46 +- 3.31	0.109 +- 0.149	1.09 +- 0.215
TOTAL	0.0502 +- 0.0953	1.01 +- 0.532	0.808 +- 0.179	6.37 +- 3.93	0.13 +- 0.188	1.21 +- 0.774

Tabla 11 Descriptivo de las moléculas estudiadas. Se recoge media y desviación típica de cada molécula y de cada parámetro estudiado: porcentaje de espermatozoides con la molécula en membrana (%spz) y la mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada (nMIF).

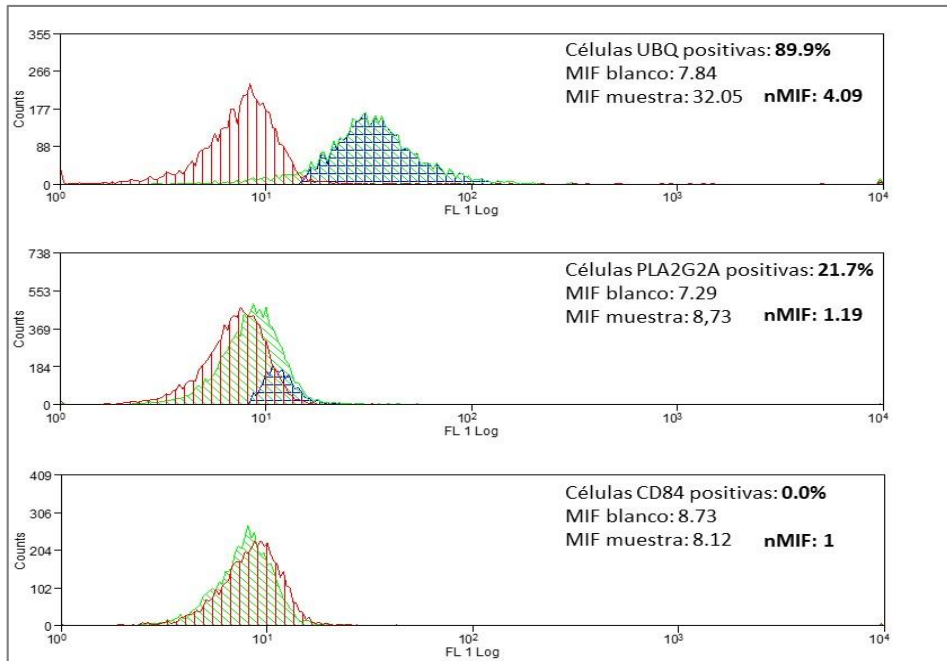


Figura 18 Histogramas donde se muestra la fluorescencia de tres muestras representativas de cada una de las moléculas analizadas. En rojo se representa la fluorescencia del blanco realizado omitiendo el anticuerpo primario. En verde la fluorescencia de las muestras tratadas con ambos anticuerpos. En azul se representa el porcentaje de espermatozoides positivos para cada una de las tres proteínas, cuyo valor numérico se recoge en cada histograma. Además, en cada uno de los tres casos se muestra el valor de la mediana de fluorescencia tanto del blanco (MIF blanco) como de la muestra (MIF muestra) y el cociente entre ambos, que representa el valor normalizado de cada muestra (nMIF).

11. OBJETIVO 1.1. Relación de CD84, PLA2G2A y UBQ con los parámetros seminales.

En este objetivo se relacionó la expresión de las tres moléculas en estudio con los parámetros básicos del semen evaluados en un espermiograma (volumen, concentración y movilidad).

11.1 Datos descriptivos de las características seminales.

Las 237 muestras seminales analizadas pertenecían a 232 pacientes cuya media de edad fue de $38,29 \pm 5,08$ años.

A continuación, recogidos en la Tabla 12, se muestran los valores descriptivos de los parámetros seminales evaluados de las muestras en **fresco**.

Parámetros seminales en fresco				
Volumen (ml)	Concentración (mill/ml)	Progresivos (%)	No progresivos (%)	Inmóviles (%)
$3,08 \pm 1,45$	$53,7 \pm 31,3$	$44 \pm 14,1$	$8,3 \pm 5,99$	$47,8 \pm 14,1$
<0,001**	<0,001**	0,604	<0,001**	<0,05*

Tabla 12 Parámetros descriptivos de las muestras seminales en fresco. Se presenta la media \pm la desviación estándar y el resultado del test de Shapiro para cada parámetro.

También fueron recogidos y se presentan a continuación (Tabla 13), los datos de la concentración y la movilidad de las muestras después de su **capacitación**, paso previo a su utilización en el correspondiente tratamiento.

Parámetros seminales en capacitado			
Concentración (mil/ml)	Progresivos (%)	No progresivos (%)	Inmóviles (%)
$12,6 \pm 9,82$	$89,3 \pm 13,2$	$4,77 \pm 7,18$	$6,05 \pm 8,45$
<0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**

Tabla 13 Parámetros descriptivos de las muestras seminales en capacitado. Se presenta la media \pm la desviación estándar y el resultado del test de Shapiro para cada parámetro.

Debido a que el tipo de capacitación es diferente dependiendo si el tratamiento a realizar es una IAH o una FIV (ya sea con ovocitos donados o propios), como ya se

ha explicado en el material y métodos, también se presentan los datos separados según el tipo de capacitación realizada, si era para IAH o para FIV (Tabla 14).

Parámetros seminales en capacitado según tipo de procesado				
	Concentración (mill/ml)	Progresivos (%)	No progresivos (%)	Inmóviles (%)
IAH (43)	23,2 ± 12	71,1 ± 15,9	15,4 ± 9,05	13,5 ± 11
	<0,001*	0,322	0,018*	<0,001*
FIV (195)	10,1 ± 7,26	93,7 ± 7,61	2,15 ± 3,11	4,28 ± 6,63
	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*

Tabla 14 Parámetros descriptivos de las muestras seminales capacitadas, separado por tipo de capacitación. Se presenta la media \pm la desviación estándar y el test de Shapiro para cada parámetro. Entre paréntesis se recoge la n para cada uno de los tipos de capacitación.

Como se aprecia en la Tabla 14 la mayoría de los parámetros no siguen una distribución normal (Test Shapiro, p valor<0,05). Seguidamente se comparó la distribución de los parámetros estudiados entre los dos tipos de capacitación, para cada una de las moléculas, mediante un test de Kruskal-Wallis de comparación de grupos. Dicha prueba determinó que, en ninguno de los parámetros, los dos grupos se distribuían de la misma forma (p<0,001).

11.2 Análisis de características seminales en relación con CD84, PLA2G2A y UBQ.

11.2.1 CD84

El análisis de la relación entre el porcentaje de espermatozoides positivos para CD84 y los parámetros seminales de las 50 muestra en **fresco** mostró que no existe ninguna relación lineal entre ellos. Lo mismo resultó de comparar la intensidad de fluorescencia de las muestras con los mismos parámetros seminales en fresco (Tabla 15).

		% spz CD84	nMIF CD84
Volumen	Coef. correlación	0,148	0,162
	p.valor	0,305	0,261
Concentración	Coef. correlación	-0,030	0,005
	p.valor	0,835	0,975
Progresivos	Coef. correlación	0,185	0,145
	p.valor	0,199	0,315
No progresivos	Coef. correlación	-0,014	-0,057
	p.valor	0,923	0,700
Inmóviles	Coef. correlación	-0,226	-0,153
	p.valor	0,114	0,290

Tabla 15 Correlaciones de Pearson de las características seminales de las muestras en fresco con los valores de porcentaje de espermatozoides positivos para CD84 (%spz CD84) y los valores de nMIF para CD84 (nMIF CD84).

En cuanto a la relación entre la presencia de CD84 y los parámetros seminales tras el proceso de **capacitación**, se realizaron dos análisis diferentes, uno para cada tipo de capacitación según el tratamiento para el que estaba destinada la muestra -IAH o FIV (ya fuera con ovocitos donados o propios)- para cada uno de los parámetros estudiados. Tampoco estos análisis mostraron ninguna asociación entre los parámetros seminales estudiados en el capacitado y la presencia de esta molécula en los espermatozoides analizados (Tabla 16). Las representaciones gráficas de estos resultados se recogen en las Figura 19 y Figura 20.

		% spz CD84		nMIF CD84
IAH	Concentración	Coef. correlación	0,048	0,604
		p.valor	0,902	0,085
	Progresivos	Coef. correlación	0,099	-0,096
		p.valor	0,801	0,806
	No progresivos	Coef. correlación	-0,230	-0,042
		p.valor	0,551	0,914
	Inmóviles	Coef. correlación	-0,042	0,146
		p.valor	0,915	0,708
ICSI	Concentración	Coef. correlación	-0,007	-0,115
		p.valor	0,967	0,473
	Progresivos	Coef. correlación	-0,033	-0,081
		p.valor	0,832	0,614
	No progresivos	Coef. correlación	0,118	0,163
		p.valor	0,474	0,322
	Inmóviles	Coef. correlación	-0,002	0,034
		p.valor	0,988	0,831

Tabla 16 Correlaciones de Pearson de las características seminales de las muestras tras ser capacitadas con los valores de porcentaje de espermatozoides positivos para CD84 (%spz CD84) y los valores de nMIF para CD84 (nMIF CD84), separadas por tipo de capacitación según el tratamiento a realizar.

11.2.2 PLA2G2A

En cuanto a las relaciones estudiadas entre los parámetros seminales en **fresco** y la presencia de PLA2G2A en las 131 muestras analizadas, se determinó que ninguno de los parámetros analizados se relacionaba ni con el porcentaje de espermatozoides con esta molécula en su membrana, ni con la mediana de la intensidad de fluorescencia (Tabla 17).

		% spz PLA2G2A	nMIF PLA2G2A
Volumen	Coef. correlación	0,144	0,071
	p.valor	0,100	0,421
Concentración	Coef. correlación	-0,055	0,059
	p.valor	0,533	0,504
Progresivos	Coef. correlación	0,027	0,086
	p.valor	0,763	0,326
No progresivos	Coef. correlación	0,011	0,038
	p.valor	0,901	0,669
Inmóviles	Coef. correlación	-0,022	-0,096
	p.valor	0,807	0,275

Tabla 17 Correlaciones de Pearson de las características seminales de las muestras en fresco con los valores de porcentaje de espermatozoides positivos para PLA2G2A (%spz PLA2G2A) y los valores de nMIF para PLA2G2A (nMIF PLA2G2A).

El análisis de la relación entre los parámetros seminales en las muestras **capacitadas** para IA y la presencia de PLA2G2A en los espermatozoides de las muestras, no ha demostrado ninguna relación lineal.

Sin embargo, en el caso de las muestras capacitadas para FIV, se ha encontrado una relación lineal y significativa entre la presencia de la molécula (tanto el porcentaje de espermatozoides con la molécula, como la cantidad relativa de molécula por espermatozoide) y el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos ($p < 0,05$), así como con el porcentaje de inmóviles ($p < 0,05$) (siendo una relación negativa en el primer caso y positiva en el segundo). Además también se ha detectado una relación lineal y negativa entre la concentración de la muestra y el porcentaje de espermatozoides positivos para PLA2G2A ($p < 0,05$), y la cantidad relativa de molécula por espermatozoide ($p < 0,01$) (Tabla 18) (Figura 19 y Figura 20).

		% spz PLA2G2A		nMIF PLA2G2A
IAH	Concentración	Coef. correlación	0,141	0,194
		p.valor	0,441	0,289
	Progresivos	Coef. correlación	-0,005	0,001
		p.valor	0,979	0,996
	No progresivos	Coef. correlación	-0,104	-0,091
		p.valor	0,570	0,622
	Inmóviles	Coef. correlación	0,095	0,076
		p.valor	0,604	0,681
ICSI	Concentración	Coef. correlación	-0,215	-0,250
		p.valor	0,033*	0,013*
	Progresivos	Coef. correlación	-0,215	-0,200
		p.valor	0,033*	0,048*
	No progresivos	Coef. correlación	0,026	0,083
		p.valor	0,800	0,424
	Inmóviles	Coef. correlación	0,240	0,200
		p.valor	0,018*	0,048*

Tabla 18 Correlaciones de Pearson de las características seminales de las muestras tras ser capacitadas con los valores de porcentaje de espermatozoides positivos para PLA2G2A (%spz PLA2G2A) y los valores de nMIF para PLA2G2A (nMIF PLA2G2A), separadas por tipo de capacitación según el tratamiento a realizar.

11.2.3 UBQ

En el caso del análisis de la relación entre la presencia de UBQ y los parámetros seminales en **fresco** (120 muestras seminales) se observaron algunas asociaciones.

Se encontró una correlación negativa entre el volumen en fresco de la muestra y tanto el porcentaje de espermatozoides con UBQ en su membrana ($p<0,05$), como la cantidad relativa de UBQ por espermatozoide ($p<0,05$) (Tabla 19).

Sin embargo, se ha encontrado una correlación positiva entre la concentración de espermatozoides en la muestra en fresco y el porcentaje de espermatozoides positivos para UBQ ($p<0,01$) y la misma asociación se observó con el nivel de proteína por espermatozoide de la muestra ($p<0,01$) (Tabla 19).

En cuanto al análisis de la relación entre la movilidad y la presencia de UBQ, se observa una correlación positiva entre la cantidad relativa de UBQ por espermatozoide y el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva ($p<0,01$) y una correlación negativa con el porcentaje de espermatozoides sin movilidad ($p<0,05$). La única asociación encontrada entre el porcentaje de espermatozoides con UBQ y los parámetros de la movilidad es una relación negativa con el porcentaje de espermatozoides con movilidad no progresiva ($p<0,05$) (Tabla 19).

		% spz UBQ	nMIF UBQ
Volumen	Coef. correlación	-0,195	-0,194
	p.valor	0,033*	0,034*
Concentración	Coef. correlación	0,264	0,243
	p.valor	0,004**	0,008**
Progresivos	Coef. correlación	0,084	0,245
	p.valor	0,362	0,007**
No progresivos	Coef. correlación	-0,194	-0,137
	p.valor	0,034*	0,137
Inmóviles	Coef. correlación	-0,006	-0,184
	p.valor	0,950	0,044*

Tabla 19 Correlaciones de Pearson de las características seminales de las muestras en fresco con los valores de porcentaje de espermatozoides positivos para la UBQ (%spz UBQ) y los valores de nMIF para UBQ (nMIF UBQ).

Los resultados de los análisis de la correlación entre los parámetros del semen **capacitado** y la presencia de UBQ en los espermatozoides se recogen en la Tabla 20. Únicamente se ha encontrado relación lineal entre el porcentaje de espermatozoides positivos para la molécula y los parámetros de movilidad en las muestras capacitadas para FIV. Siendo una relación positiva en el caso del porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva ($p<0,01$) y negativa en el caso de los espermatozoides inmóviles ($p<0,01$). No se han encontrado asociaciones entre ninguno de los parámetros seminales y la cantidad relativa de UBQ por espermatozoide, ni tampoco entre los parámetros seminales de muestras

capacitadas para IA y la presencia de UBQ en dichas muestras (ya fuera medida en porcentaje de espermatozoides o en cantidad relativa de molécula por espermatozoide) (Figura 19 y Figura 20).

			% spz UBQ	nMIF UBQ
IAH	Concentración	Coef. correlación	-0,096	-0,184
		p.valor	0,756	0,547
	Progresivos	Coef. correlación	-0,290	-0,324
		p.valor	0,336	0,280
	No progresivos	Coef. correlación	0,416	0,203
		p.valor	0,157	0,506
	Inmóviles	Coef. correlación	0,096	0,305
		p.valor	0,756	0,311
ICSI	Concentración	Coef. correlación	0,160	0,080
		p.valor	0,100	0,415
	Progresivos	Coef. correlación	0,337	0,049
		p.valor	< 0,001*	0,615
	No progresivos	Coef. correlación	-0,078	-0,062
		p.valor	0,433	0,532
	Inmóviles	Coef. correlación	-0,329	-0,010
		p.valor	< 0,001*	0,922

Tabla 20 Correlaciones de Pearson de las características seminales de las muestras tras ser capacitadas con los valores de porcentaje de espermatozoides positivos para UBQ (%spz UBQ) y los valores de nMIF para UBQ (nMIF UBQ), separadas por tipo de capacitación según el tratamiento a realizar.

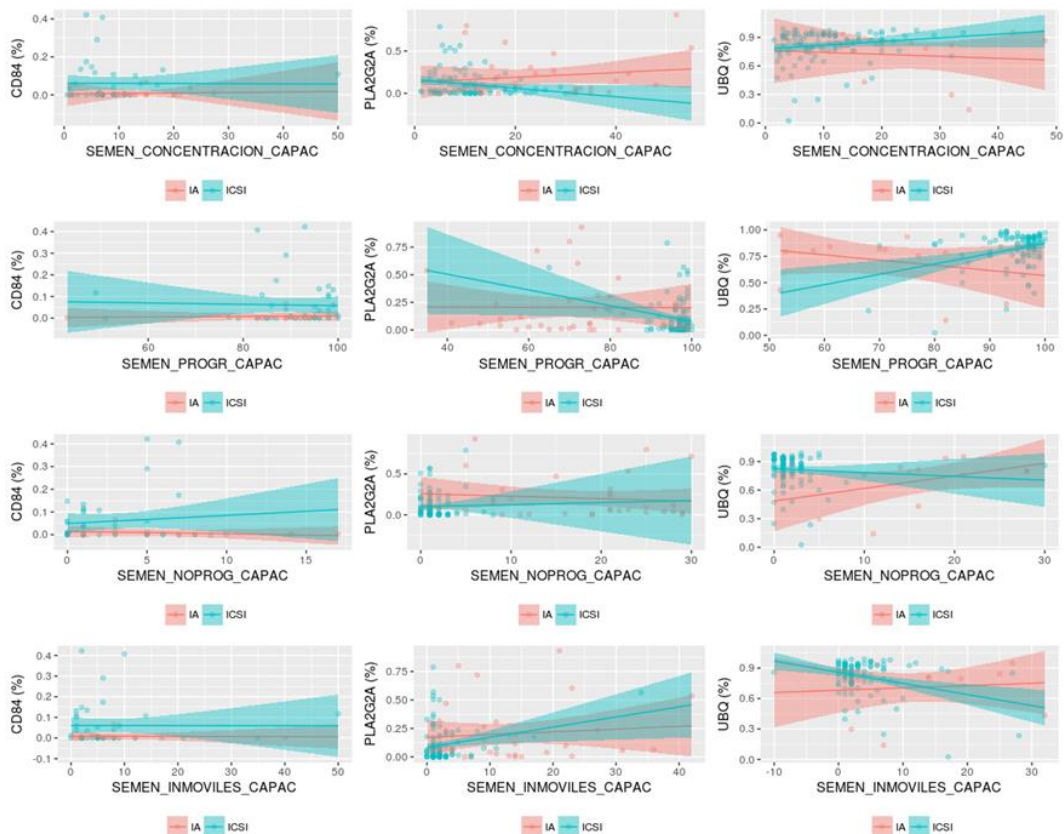


Figura 19 Representación gráfica de las asociaciones entre los parámetros seminales (concentración, porcentaje de espermatozoides móviles progresivos, no progresivos e inmóviles) de las muestras capacitadas (para tratamiento de IA o de FIV-ICSI-) y el porcentaje de espermatozoides con la molécula en estudio (CD84, PLA2G2A o UBQ) en su membrana.

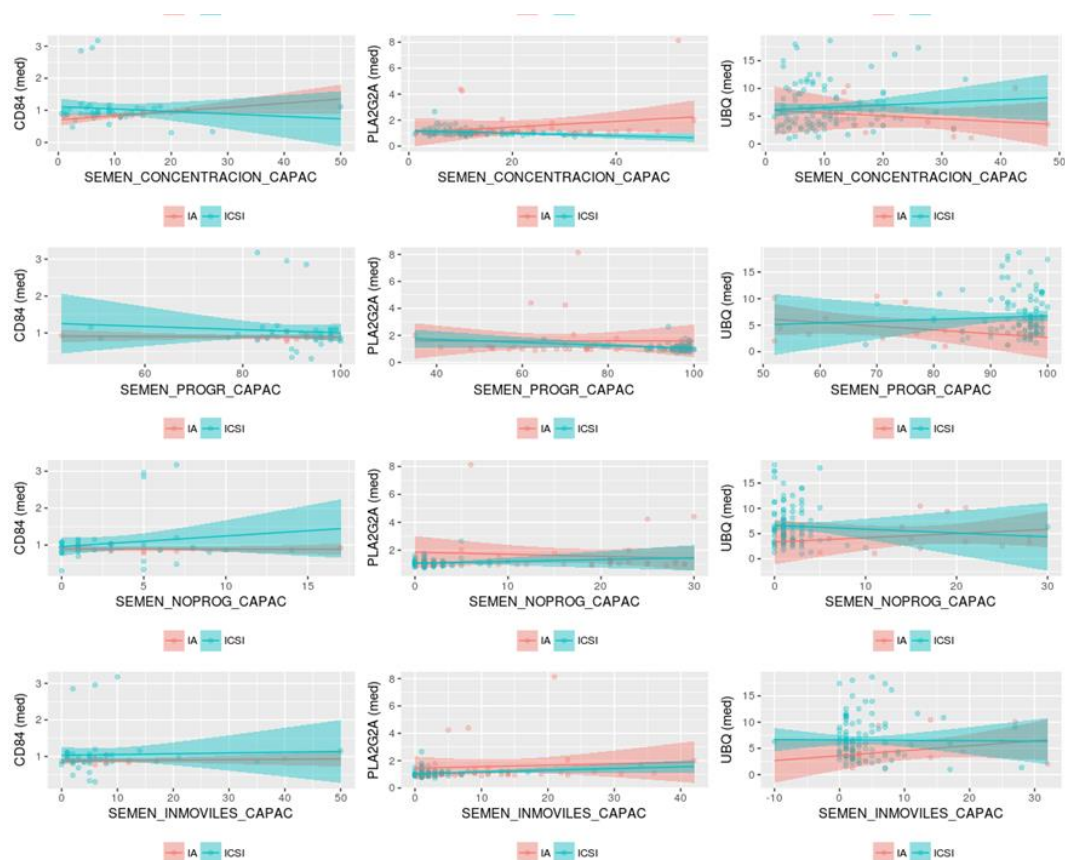


Figura 20 Representación gráfica de las asociaciones entre los parámetros seminales (concentración, porcentaje de espermatozoides móviles progresivos, no progresivos e inmóviles) de las muestras capacitadas (para tratamiento de IAH o de FIV-ICSI-) y la cantidad relativa de cada una de las moléculas (CD84, PLA2G2A o UBQ) por espermatozoide.

12. OBJETIVO 1.2. Relación de CD84, PLA2G2A y UBQ con los parámetros embrionarios.

Para este objetivo se han analizado los embriones de los 194 ciclos/193 pacientes incluidos en el estudio (101 ciclos/100 pacientes sometidos a tratamientos de FIV con sus propios gametos y 93 ciclos/93 pacientes con ovocitos donados).

El total de embriones generados en tratamientos de FIV, con muestras de semen en las que se había analizado la presencia de alguna de las moléculas estudiadas fue de 1428 (788 en ciclos de donación de óvulos y 640 en ciclos con ovocitos propios). Concretamente en 310 embriones se había analizado la presencia de CD84 en las muestras seminales, en 721 embriones la presencia de PLA2G2A y en 772 la de UBQ.

12.1 Embriones viables

De toda la cohorte de embriones fecundados no todos resultan en embriones viables, en este apartado se ha buscado si existe relación entre la probabilidad de tener mayor cantidad de embriones viables en una cohorte embrionaria con la presencia de nuestras moléculas en las muestras de espermatozoides utilizadas para generar dichos embriones.

En la Tabla 21 se recogen los resultados de los modelos estadísticos mixtos acumulados, en términos de *odds ratio* (OR), es decir la relación de probabilidad de una categoría con respecto a otra (no viables/ viables en este caso). Separado por tipo de tratamiento (ovocitos propios o donados), por molécula analizada y por variable descriptora de la presencia de dicha molécula (cantidad de espermatozoides positivos para la molécula, expresado en tanto por uno y mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada).

Tipo de tratamiento	Molécula	Variables presencia	OR	IC95%	P valor
Propios	CD84 (n=191)	%spz	1,667	[-5,81 - 4,79]	0,850
		nMIF	0,848	[-0,74 - 1,07]	0,722
	PLA2G2A (n=221)	%spz	0,018	[0,38 - 7,67]	0,030*
		nMIF	0,073	[0,29 - 4,96]	0,028*
	UBQ (n=345)	%spz	0,398	[0,92 - 0,92]	<0,05*
		nMIF	0,988	[-0,05 - 0,07]	0,696
Donados	CD84 (n=122)	%spz	54,966	[-8,77 - 0,75]	0,099
		nMIF	2,071	[-1,59 - 0,13]	0,096
	PLA2G2A (n=494)	%spz	0,924	[-1,53 - 1,68]	0,923
		nMIF	0,972	[-1,09 - 1,14]	0,960
	UBQ (n=423)	%spz	2,166	[-3,89 - 2,34]	0,627
		nMIF	1,006	[-0,09 - 0,08]	0,894

Tabla 21 Resultados de los CLMM para evaluar la relación entre la presencia de las moléculas en los espermatozoides y la probabilidad de generar embriones no viables con respecto a embriones viables, (%spz: cantidad de espermatozoides positivos para la molécula, expresado en tanto por uno y nMIF: mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada). Entre paréntesis se presenta el número de embriones analizados para cada caso.

No se ha encontrado ninguna asociación significativa entre la probabilidad de tener embriones no viables con la presencia de CD84 en los espermatozoides utilizados para tratamiento de FIV (ni con ovocitos propios, ni con donados).

Sin embargo, se ha encontrado una correlación significativa y negativa con la presencia de PLA2G2A en espermatozoides utilizados en TRA con ovocitos propios y la probabilidad de generar embriones no viables (porcentaje de espermatozoides positivos – $p < 0,05$ - cantidad relativa de proteína por espermatozoide – $p > 0,05$ -).

Es decir, la probabilidad de tener embriones viables en una cohorte embrionaria aumenta 55,56 ($1/OR=1/0,018$) veces cuando el aumento de la presencia de esta molécula es del 100% o dicho de otro modo. Del mismo modo ocurre con la intensidad de fluorescencia normalizada para esta molécula, por cada unidad que esta aumenta en la muestra de espermatozoides la probabilidad de tener embriones viables aumenta ($1/0,073$)= 13,70 veces con respecto a los no viables.

En el caso de la UBQ también se ha encontrado una relación significativa y negativa entre la presencia de esta molécula en los espermatozoides (porcentaje de espermatozoides positivos $p < 0,05$) utilizados en tratamientos con ovocitos propios y la probabilidad de tener embriones no viables en dichos tratamientos.

En el caso de la UBQ, la probabilidad de tener embriones viables en una cohorte procedente de un tratamiento de FIV con ovocitos propios con respecto a los no viables aumenta ($1/0,378=$) 2,5 veces cuando el porcentaje de espermatozoides con UBQ pasa del 0 a 100%.

Se muestran en las Figura 21 la variación de las probabilidades de tener embriones viables y no viables en una cohorte embrionaria según varía la presencia de las moléculas estudiadas en las muestras de espermatozoides utilizadas para los tratamientos.

En términos estadísticos, en estas gráficas se muestra la tendencia lineal de las probabilidades de cada categoría (viable o no viable) según lo que predice el modelo de regresión. Dicha representación de probabilidades se hace de forma acumulada, esto es, la probabilidad que representa a cada categoría se suma con las anteriores. De este modo podemos observar, a medida que aumenta la presencia de moléculas, la tendencia lineal de aumento o disminución del reparto probabilístico de cada categoría en cada punto.

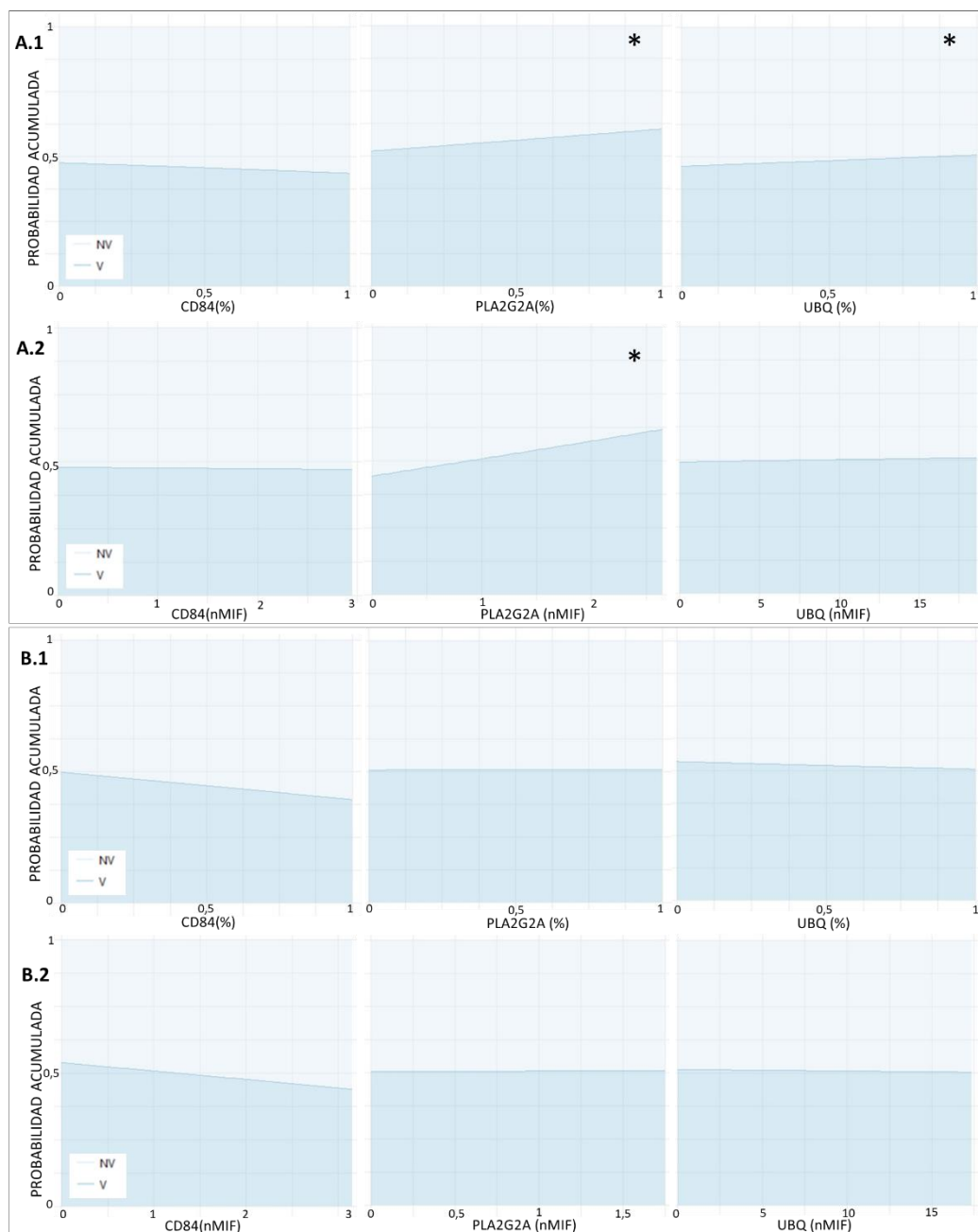


Figura 21 Representación gráfica de la tendencia lineal de la probabilidad de obtener embriones viables (V) o no viables (NV) en una cohorte embrionaria tras FIV con ovocitos propios (A) y con ovocitos donados (B) cuando varía la presencia de las tres moléculas en la muestra de espermatozoides, medida dicha presencia en tanto por 1 (A.1 y B.1) como la mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada (A.2 y B.2) (*)=relación significativa.

12.2 Número de células en día 3 de desarrollo

El número de células de un embrión en el tercer día de su desarrollo se considera un factor importante en el potencial de implantación del mismo (ASEBIR. 2015). Por ello, en este estudio se ha evaluado la posible relación entre el número de células de un embrión en su día 3 y la presencia de CD84, PLA2G2A y UBQ en la muestra de espermatozoides utilizada para generar dichos embriones. Se han creado tres categorías de embriones según el número de células que presentaban: los de máximo potencial de implantación (7-8 células) (ASEBIR. 2015), los de desarrollo más lento (<7 células) y los más rápidos (>8 células).

Los resultados estadísticos de los modelos CLMM se recogen en la Tabla 22, en términos de *odds ratio* (OR). Se muestra la relación de probabilidad media entre las tres categorías, según: el tipo de tratamiento (ovocitos propios o donados), la molécula analizada y la variable descriptora de la presencia de dicha molécula.

Tipo de tratamiento	Molécula	Variables presencia	OR	IC95%	P valor
Propios	CD84 (n=145)	%spz	0,070	[-2,06 - 7,38]	0,269
		nMIF	0,717	[-0,46 - 1,13]	0,410
	PLA2G2A (n=223)	%spz	0,505	[-1,44 - 2,81]	0,529
		nMIF	0,627	[-0,69 - 1,63]	0,430
	UBQ (n=341)	%spz	0,302	[-0,43 - 2,82]	0,148
		nMIF	0,951	[-0,02 - 0,12]	0,166
Donados	CD84 (n=122)	%spz	14,307	[-5,82 - 0,50]	0,099
		nMIF	1,606	[-1,03 - 0,09]	0,098
	PLA2G2A (n=498)	%spz	1,940	[-2,57 - 1,24]	0,496
		nMIF	1,964	[-1,99 - 0,64]	0,316
	UBQ (n=430)	%spz	1,785	[-3,83 - 2,67]	0,727
		nMIF	0,975	[-0,06 - 0,11]	0,573

Tabla 22 Resultados de los CLMM para evaluar la relación entre la presencia de las moléculas en los espermatozoides y el número de células en día 3 de desarrollo de los embriones generados, (%spz: cantidad de espermatozoides positivos para la molécula, expresado en tanto por uno y nMIF: mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada). Entre paréntesis se presenta el número de embriones analizados para cada caso.

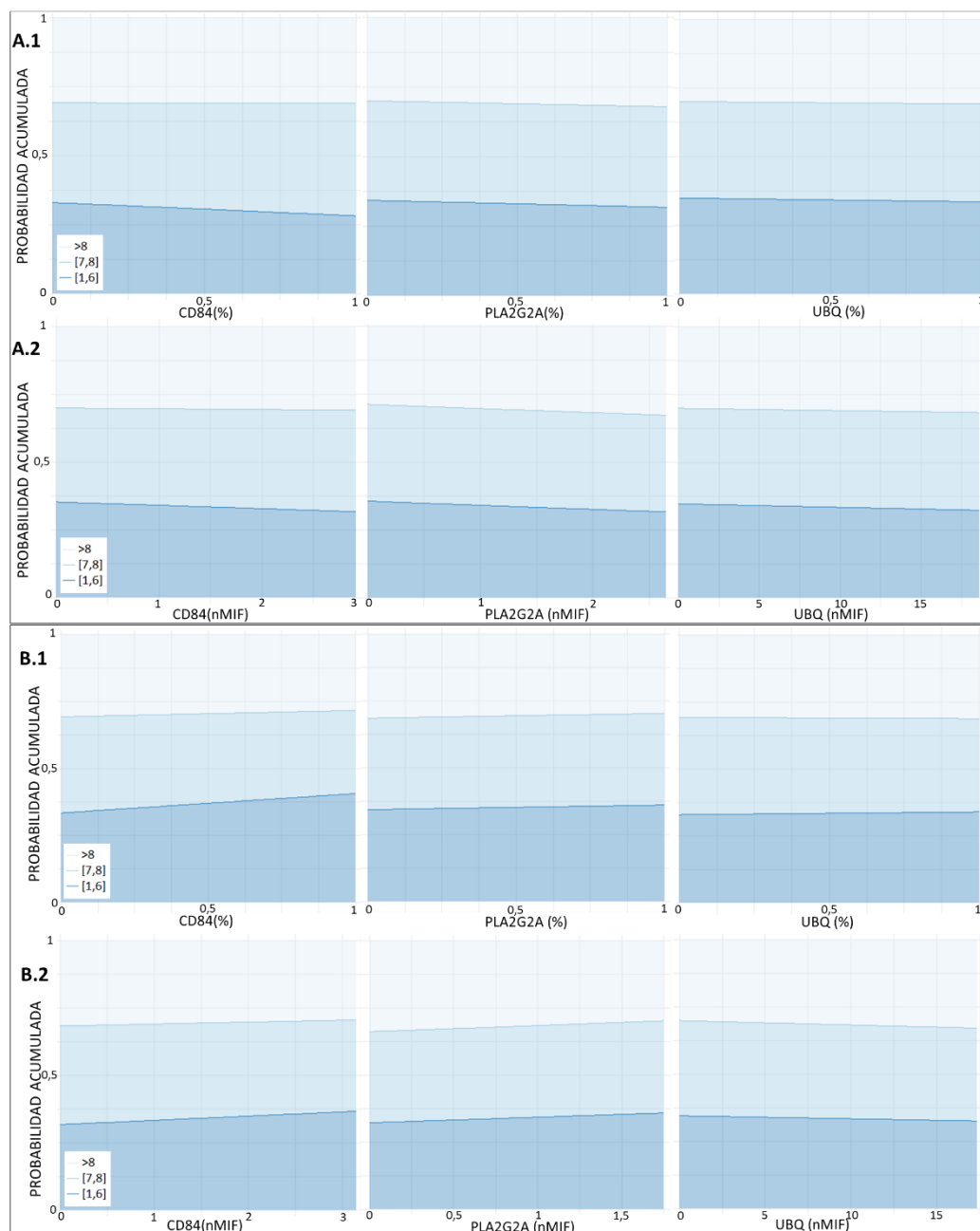


Figura 22 Representación gráfica de tendencia lineal de las probabilidades de tener embriones con más de 8 células, 7 u 8 células y menos de 7 células, en el día 3 de desarrollo, tras un FIV con ovocitos propios (A) y con ovocitos donados (B). Con el aumento de la presencia de las tres moléculas en la muestra de espermatozoides, medida como cantidad de espermatozoides con la molécula (tanto por 1) (A.1 y B.1) y mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada (A.2 y B.2) (*)=relación significativa.

No se ha encontrado ninguna asociación lineal significativa entre la probabilidad de tener embriones de uno de los tres grupos definidos con respecto al número de células en día 3 de desarrollo, con la presencia de ninguna de las tres moléculas estudiadas en los espermatozoides utilizados para tratamiento de FIV (ni con ovocitos propios, ni con donados).

En la Figura 22 se representa únicamente la tendencia lineal de las probabilidades de cada categoría según lo que predice el modelo de regresión. Dicha representación de probabilidades se hace de forma acumulada, esto es, la probabilidad que representa a cada categoría se suma con las anteriores. De este modo podemos observar, a medida que aumenta la presencia de moléculas, la tendencia lineal de aumento o disminución del reparto probabilístico de cada categoría en cada punto.

12.3 Porcentaje de fragmentación en día 3 de desarrollo.

También la fragmentación se ha visto que es un parámetro influyente en la capacidad de implantación de un embrión (ASEBIR. 2015). En este apartado se han establecido 4 nuevos puntos de corte, dividiendo la muestra en 4 grupos según su fragmentación (0-5%, 5-10%, 10-15%, 15-100%). Esto es así debido a que nuestra población de embriones en estudio presentaba una gran acumulación de embriones entre 5 y 15% de fragmentación. Por lo tanto, la información en cuanto al análisis de la relación entre el porcentaje de fragmentación de los embriones y la presencia de las proteínas en estudio en las muestras de semen, ha de interpretarse con precaución, por sus limitaciones.

Los resultados, en términos de OR, de los CLMM de todas las variables analizadas se recogen en la Tabla 23. Se muestra la relación de probabilidad media entre las cuatro categorías, según: el tipo de tratamiento (ovocitos propios o donados), la molécula analizada y la variable descriptora de la presencia de dicha molécula.

Tipo de tratamiento	Molécula	Variables presencia	OR	IC95%	P valor
Propios	CD84 (n=191)	%spz	130,404	[-13,3 - 3,59]	0,259
		nMIF	2,032	[-2,26 - 0,84]	0,370
	PLA2G2A (n=224)	%spz	0,375	[-1,79 - 3,76]	0,488
		nMIF	0,780	[-1,25 - 1,75]	0,745
	UBQ (n=345)	%spz	0,662	[-1,56 - 2,39]	0,682
		nMIF	1,128	[-0,21 - 0,03]	0,006**
Donados	CD84 (n=122)	%spz	0,044	[-2,07 - 8,32]	0,239
		nMIF	0,864	[-0,80 - 1,1]	0,763
	PLA2G2A (n=497)	%spz	0,285	[-1,16 - 3,67]	0,308
		nMIF	0,398	[-0,76 - 2,6]	0,282
	UBQ (n=430)	%spz	0,562	[-4,19 - 5,34]	0,812
		nMIF	1,003	[-0,13 - 0,13]	0,962

Tabla 23 Resultados de los CLMM para evaluar la relación entre la presencia de las moléculas en los espermatozoides y el porcentaje de fragmentación en día 3 de los embriones generados. (%spz: cantidad de espermatozoides positivos para la molécula, expresado en tanto por uno y nMIF: mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada). Entre paréntesis se presenta el número de embriones analizados para cada caso.

Se observó que en los pacientes con ovocitos donados no hay diferencias estadísticamente significativas entre los distintos niveles de fragmentación de los embriones evaluados en día 3 de desarrollo, en ninguna de las proteínas analizadas.

En el caso de los embriones procedentes de ciclos de ICSI con ovocitos propios únicamente se ha encontrado una disminución significativa de la probabilidad de tener embriones con mayor fragmentación cuando aumenta la cantidad relativa de UBQ por espermatozoide de la muestra utilizada para el tratamiento ($p < 0,01$). Dicho de otro modo, por cada unidad que aumenta la intensidad de fluorescencia normalizada para la UBQ en la muestra de espermatozoides, la probabilidad de que los embriones presenten una fragmentación de categoría inferior (menos fragmentados) aumenta 1,13 veces.

Se recoge en la Figura 23 la variación de las probabilidades de tener, en una cohorte embrionaria, embriones más o menos fragmentados en su día 3, según varía la

presencia de las moléculas estudiadas en las muestras de espermatozoides utilizadas para los tratamientos. Es nuevamente una representación de la tendencia lineal de las probabilidades de cada categoría según lo que predice el modelo de regresión, de forma acumulada como ya se ha explicado en los casos anteriores.

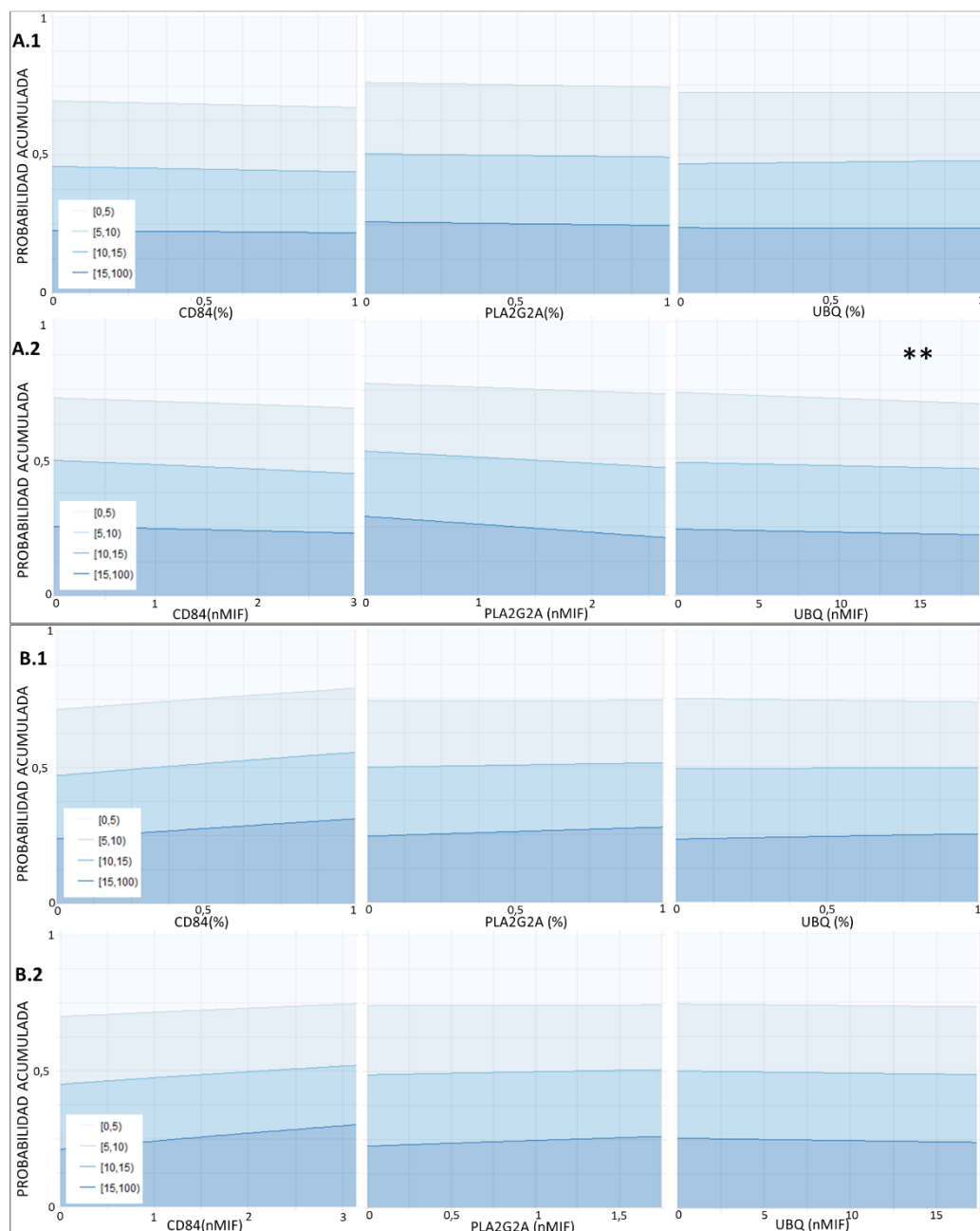


Figura 23 Representación gráfica de tendencia lineal de las probabilidades de tener embriones con distinto grado de fragmentación (0-5%; 5-10%; 10-15% y 15-100% del volumen del embrión), en el día 3 de desarrollo, tras un FIV con ovocitos propios (A) y con ovocitos donados (B). Con el aumento de la presencia de las tres moléculas en la muestra de espermatozoides, medida como cantidad de espermatozoides con la molécula (tanto por 1) (A.1 y B.1) y mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada (A.2 y B.2) (**) = relación muy significativa.

12.4 Simetría en día 3 de desarrollo

En la Tabla 24 se detallan los resultados de los CLMM para cada una de las moléculas y cada TRA, en este caso para evaluar la relación entre la presencia de las moléculas y la simetría de los embriones en día 3 de su desarrollo según los criterios de ASEBIR (ASEBIR. 2015). Los resultados se recogen en términos de OR y representan la relación de probabilidad media entre los tres tipos de simetrías analizados.

Tipo de tratamiento	Molécula	Variables presencia	OR	IC95%	P valor
Propios	CD84 (n=190)	%spz	0,449	[-10 - 11,6]	0,885
		nMIF	1,395	[-2,18 - 1,52]	0,724
	PLA2G2A (n=224)	%spz	0,692	[-2,04 - 2,78]	0,765
		nMIF	0,786	[-1,07 - 1,56]	0,720
	UBQ (n=341)	%spz	2,675	[-2,09 - 0,12]	0,081
		nMIF	0,995	[-0,04 - 0,05]	0,836
Donados	CD84 (n=119)	%spz	1,370	[-6,76 - 6,12]	0,924
		nMIF	0,802	[-0,91 - 1,35]	0,702
	PLA2G2A (n=498)	%spz	0,883	[-2,09 - 2,34]	0,913
		nMIF	0,710	[-1,19 - 1,88]	0,662
	UBQ (n=428)	%spz	0,001	[2,64 - 11,5]	0,002**
		nMIF	0,882	[0,01 - 0,25]	0,040*

Tabla 24 Resultados de los CLMM para evaluar la relación entre la presencia de las moléculas en los espermatozoides y el tipo de simetría en día 3 de los embriones generados. (%spz: cantidad de espermatozoides positivos para la molécula, expresado en tanto por uno y nMIF: mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada). Entre paréntesis se presenta el número de embriones analizados para cada caso.

No se observa ninguna relación entre la simetría de los embriones y la presencia de CD84, ni de PLA2G2A en ninguno de los dos tipos de TRA analizados.

Lo mismo ocurre con la UBQ y la simetría de los embriones procedentes de tratamientos con ovocitos propios. Sin embargo, en el caso de los tratamientos con ovocitos donados se ha encontrado una relación negativa, la simetría embrionaria en día 3 empeora con el aumento de UBQ en la muestra de espermatozoides, tanto el porcentaje de espermatozoides ($p < 0,01$) con la molécula, como la cantidad

relativa de molécula por espermatozoide ($p < 0,05$). Concretamente, la probabilidad de tener embriones de una categoría inferior (“peor”) de simetría con respecto con embriones de categorías superiores aumenta ($1/0,001=$) 1000 veces cuando el porcentaje de espermatozoides con UBQ pasa de 0 a 100% y ($1/0,882=$) 1,13 veces por cada unidad que aumenta nMIF.

En la Figura 24 se muestra la tendencia lineal de la probabilidad de cada categoría de simetría según lo que predice el modelo de regresión, de forma acumulada como ya se ha explicado.

,

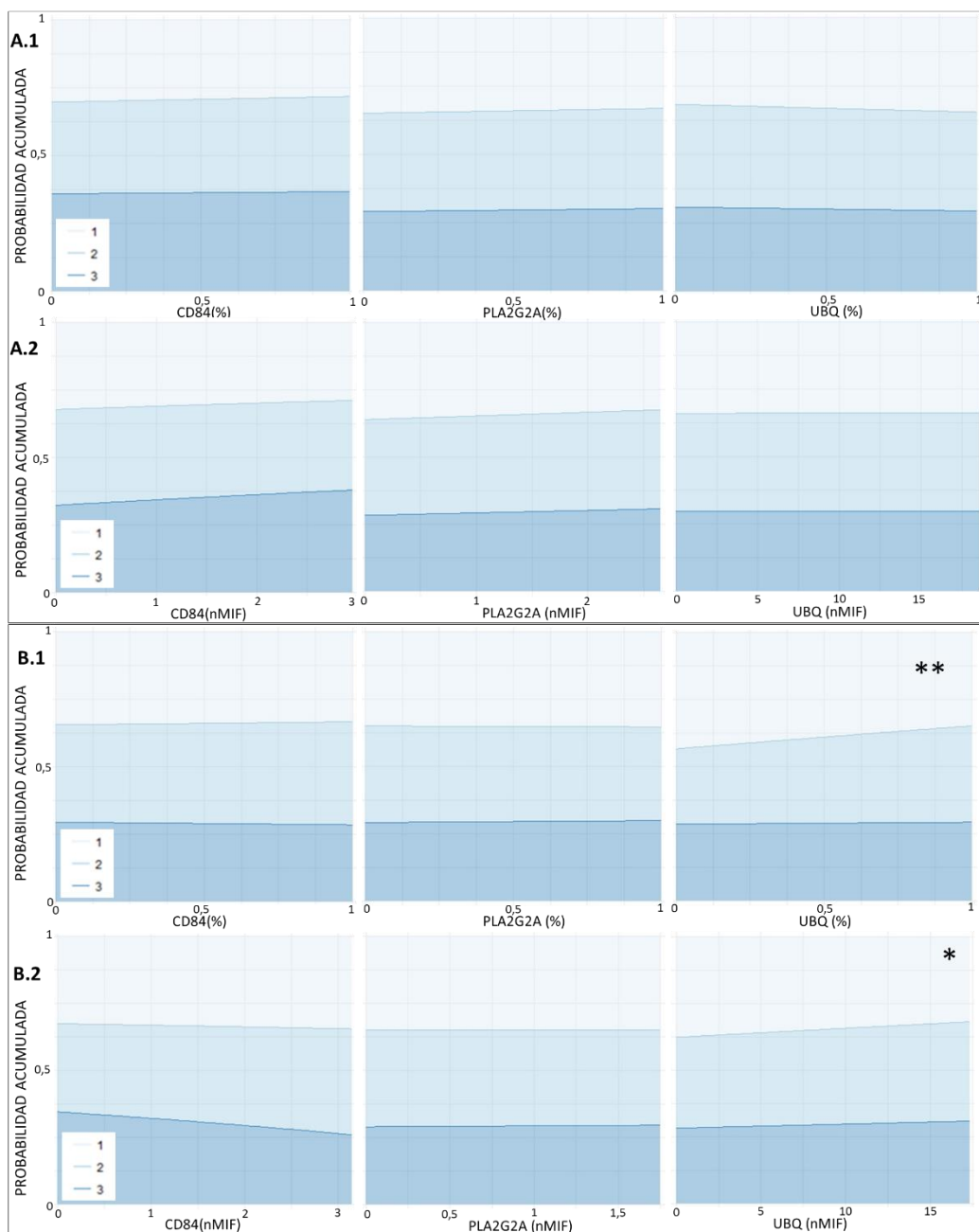


Figura 24 Representación gráfica de tendencia lineal de las probabilidades de tener más o menos simétricos (tipos 1, 2, 3 y 4), en el día 3 de desarrollo, tras un FIV con ovocitos propios (A) y con ovocitos donados (B). Con el aumento de la presencia de las tres moléculas en la muestra de espermatozoides, medida como cantidad de espermatozoides con la molécula (tanto por 1) (A.1 y B.1) y mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada (A.2 y B.2) (*)=relación entre variables significativa (**) =relación muy significativa.

12.5 Estadio en día 5 de desarrollo

Se evaluó también si la presencia de las moléculas de interés en las muestras de espermatozoides tenía alguna relación con el desarrollo de los embriones en las fases avanzadas del cultivo.

En la Tabla 25 se detallan los resultados del análisis estadístico de cada una de las moléculas, en cada uno de los tratamientos. Expresados dichos resultados como OR, mostrando más directamente la relación de probabilidad media entre las categorías definidas para este parámetro (NoE, MC, BT, BC, BHi, BH)

Tipo de tratamiento	Molécula	Variables presencia	OR	IC95%	P valor
Propios	CD84 (n=137)	%spz	0,012	[1,26 - 7,64]	0,006**
		nMIF	0,533	[0,10 - 1,15]	0,019*
	PLA2G2A (n=105)	%spz	141,248	[-11,9 - 2,02]	0,164
		nMIF	16,704	[-6,99 - 1,36]	0,186
	UBQ (n=205)	%spz	1,060	[-1,85 - 1,73]	0,949
		nMIF	1,061	[-0,14 - 0,02]	0,131
Donados	CD84 (n=91)	%spz	4,029	[-5,43 - 2,64]	0,499
		nMIF	1,329	[-0,979 - 0,41]	0,422
	PLA2G2A (n=329)	%spz	0,383	[-1,24 - 3,16]	0,392
		nMIF	0,571	[-0,95 - 2,07]	0,468
	UBQ (n=301)	%spz	0,643	[-4,16 - 5,04]	0,851
		nMIF	1,008	[-0,12 - 0,11]	0,888

Tabla 25 Resultados de los CLMM para evaluar la relación entre la presencia de las moléculas en los espermatozoides y el desarrollo de los blastocistos en día 5. (%spz: cantidad de espermatozoides positivos para la molécula, expresado en tanto por uno y nMIF: mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada). Entre paréntesis se presenta el número de embriones analizados para cada caso.

No se observa ninguna relación entre el desarrollo de los embriones en día 5 de desarrollo y la presencia de PLA2G2A, ni de UBQ, en ninguno de los dos tipos de TRA analizados.

En el caso de CD84, se ha encontrado que la probabilidad de tener embriones más desarrollados en día 5 aumenta muy significativamente cuando aumenta el

porcentaje de espermatozoides con CD84 en las muestras destinadas a tratamiento con ovocitos propios ($p < 0,01$), concretamente la probabilidad de tener embriones de categorías superiores (embriones más desarrollados) aumenta ($1/0,012 =$) 83 veces cuando el porcentaje de espermatozoides marcados aumenta de 0 a 100%. Del mismo modo, se ha encontrado una relación significativa ($p < 0,05$) y positiva entre el aumento de la intensidad de fluorescencia del CD84 en las muestras de espermatozoides y el desarrollo embrionario en día 5, siendo el aumento de esta probabilidad de ($1/0,533 =$) 1,88 por unidad de intensidad de fluorescencia normalizada.

En los gráficos de la Figura 25 se representa la variación de las probabilidades de tener embriones más o menos evolucionados en día 5 de desarrollo embrionario. De nuevo, la tendencia lineal de la probabilidad de cada categoría de desarrollo según lo que predice el modelo de regresión, de forma acumulada como ya se ha explicado.

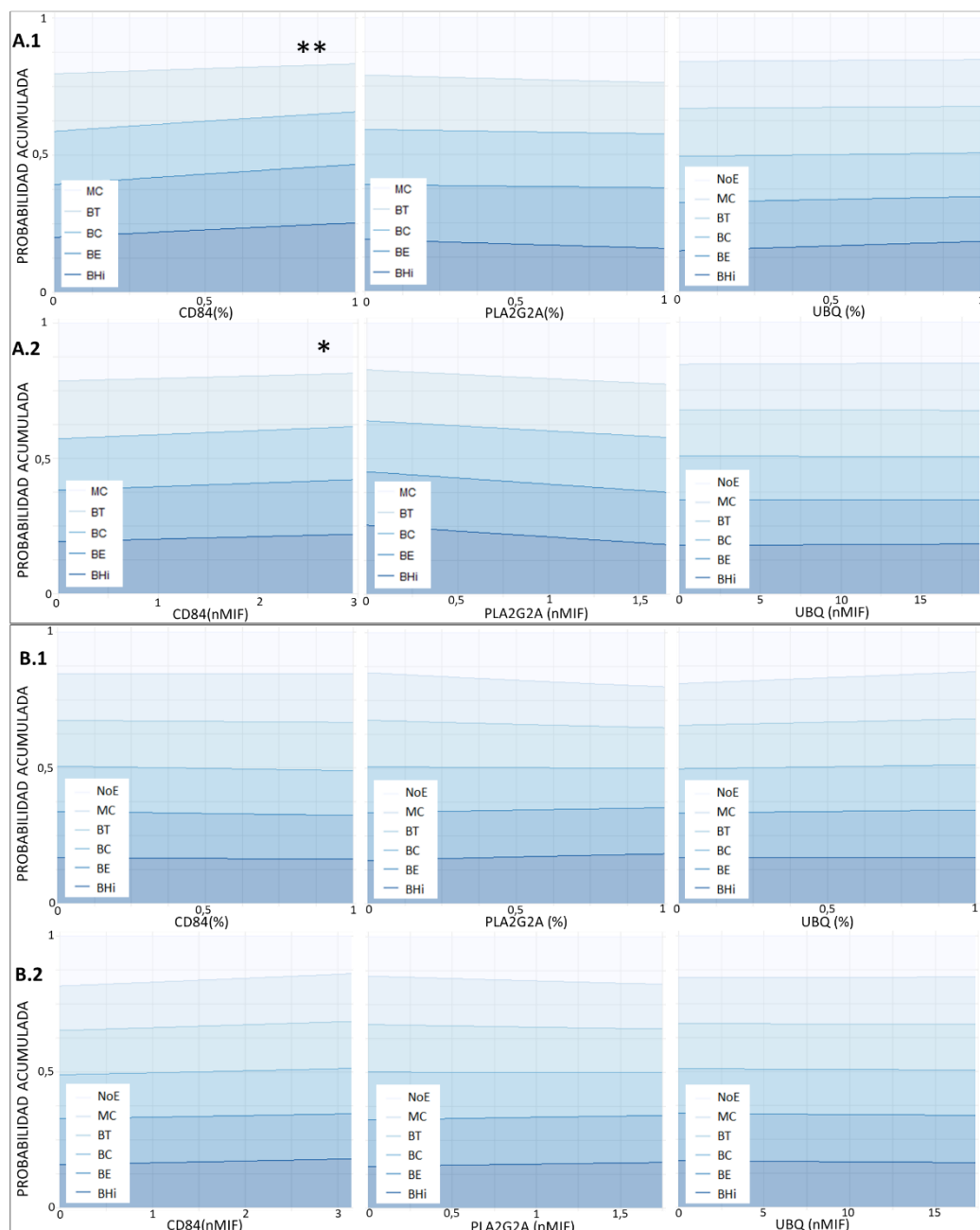


Figura 25 Representación gráfica de tendencia lineal de las probabilidades de tener embriones más o menos desarrollados en día 5 de desarrollo (BH; BHi; BC; BT, MC o NoE), tras un FIV con ovocitos propios (A) y con ovocitos donados (B). Con el aumento de la presencia de las tres moléculas en la muestra de espermatozoides, medida como cantidad de espermatozoides con la molécula (tanto por 1) (A.1 y B.1) y mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada (A.2 y B.2) (*)=relación entre variables significativa (**) =relación muy significativa.

12.6 Estadio en día 6 de desarrollo

Del mismo modo, se valoró si existía alguna relación entre la presencia de las moléculas en las muestras de espermatozoides utilizadas para los tratamientos, con el estado de desarrollo de los embriones en el sexto día de su evolución (NoE, MC, BT, BC, BHi, BH).

En la Tabla 26 se muestran los resultados de los CLMM realizados, expresados en términos de OR, en cada una de las moléculas y para cada tipo de tratamiento. En la Figura 26 se representa la tendencia lineal de la probabilidad (acumulada) de tener embriones más o menos evolucionados en su día 6, según el modelo de regresión.

Tipo de tratamiento	Molécula	Variables presencia	OR	IC95%	P valor
Propios	CD84 (n=58)	%spz	36,917	[-9,6 - 2,38]	0,238
		nMIF	0,994	[-1,08 - 1,09]	0,991
	PLA2G2A (n=50)	%spz	0,696	[-5 - 5,73]	0,895
		nMIF	0,275	[-2,25 - 4,84]	0,475
	UBQ (n=101)	%spz	1,175	[-2,51 - 2,18]	0,978
		nMIF	1,073	[-0,17 - 0,03]	0,183
Donados	CD84 (n=41)	%spz	0,762	[-5,96 - 6,5]	0,932
		nMIF	1,132	[-1,19 - 0,94]	0,819
	PLA2G2A (n=154)	%spz	0,121	[0,22 - 4,01]	0,029*
		nMIF	0,250	[0,06 - 2,71]	0,041*
	UBQ (n=132)	%spz	1,110	[-4,23 - 4,02]	0,961
		nMIF	1,003	[-0,11 - 0,10]	0,962

Tabla 26 Resultados de los CLMM para evaluar la relación entre la presencia de las moléculas en los espermatozoides y el desarrollo de los blastocistos en día 6. (%spz: cantidad de espermatozoides positivos para la molécula, expresado en tanto por uno y nMIF: mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada). Entre paréntesis se presenta el número de embriones analizados para cada caso.

No se observa ninguna relación entre el desarrollo de los embriones en día 6 de desarrollo y la presencia de CD84, ni de UBQ, en ninguno de los dos tipos de TRA analizados.

La única relación lineal estadísticamente significativa encontrada en el análisis de este parámetro es una relación positiva entre la presencia de PLA2G2A (medida con ambos parámetros: porcentaje de espermatozoides y nMIF) y el desarrollo de los blastocistos de tratamientos con ovocitos donados.

Ambas relaciones son estadísticamente significativas ($p < 0,05$), la probabilidad de tener embriones de una categoría superior en desarrollo (más evolucionados) con respecto a los de categorías inferiores aumenta ($1/0,121=$) 8,3 veces cuando el porcentaje de espermatozoides positivos para PLA2G2A en la muestra pasa de 0 a 100% y aumenta ($1/0,25=$) 4 veces por cada unidad de nMIF que aumenta la presencia de la molécula en la muestra.

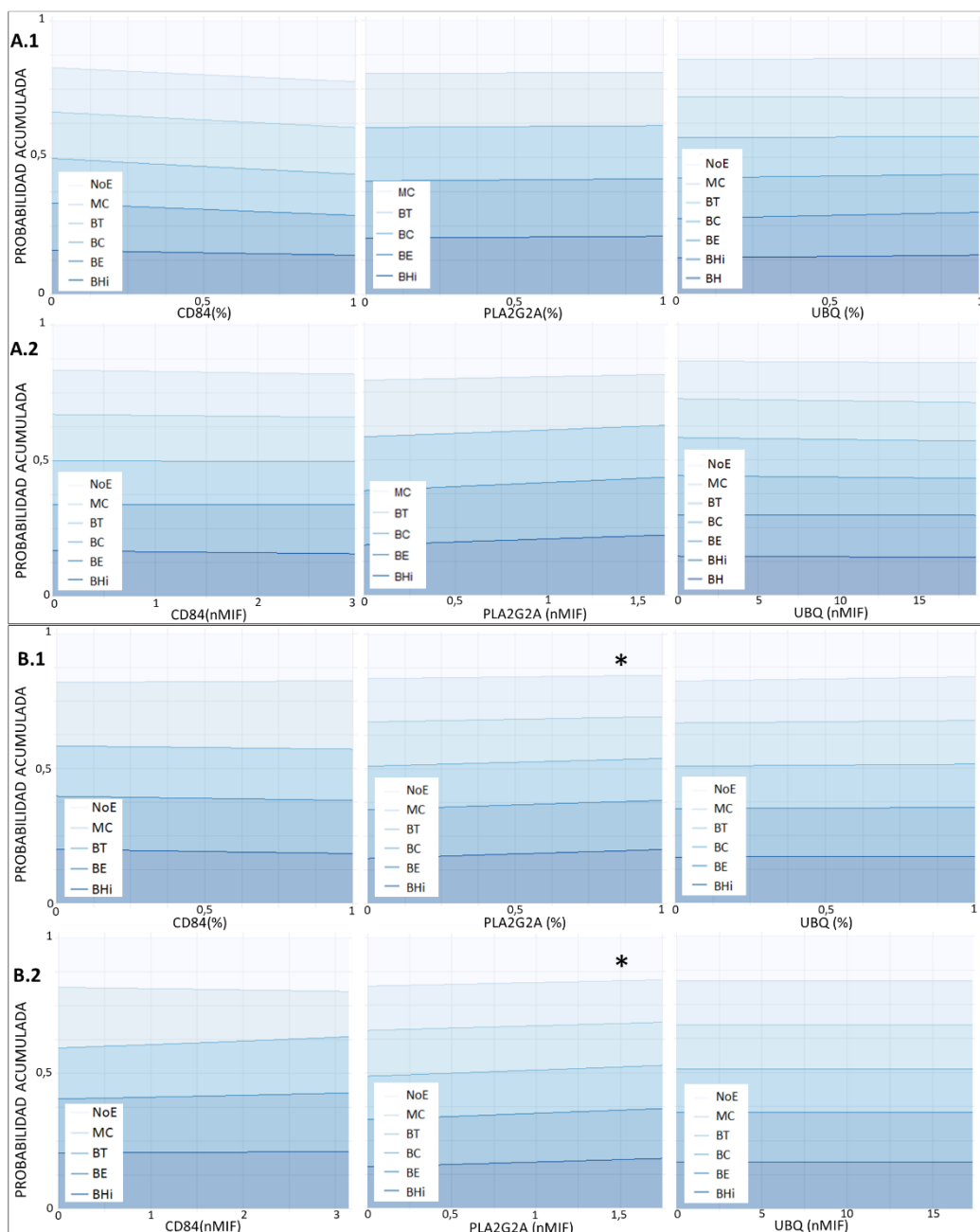


Figura 26 Representación gráfica de tendencia lineal de las probabilidades de tener embriones más o menos desarrollados en día 6 de desarrollo (BH; BHi; BC; BT, MC o NoE), tras un FIV con ovocitos propios (A) y con ovocitos donados (B). Con el aumento de la presencia de las tres moléculas en la muestra de espermatozoides, medida como cantidad de espermatozoides con la molécula (tanto por 1) (A.1 y B.1) y mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada (A.2 y B.2) (*)=relación entre variables significativa.

13. OBJETIVO 1.3. Relación de CD84, PLA2G2A y UBQ con los resultados de la TRA.

En este último apartado se han analizado los resultados de 237 ciclos de reproducción asistida, se ha estudiado su relación con la presencia de PLA2G2A, CD84 y UBQ en las muestras de espermatozoides utilizadas para estos ciclos. Los resultados se presentan separados por tipo de tratamiento (IA, ICSI con ovocitos propios y ICSI con ovocitos donados), en cada apartado se ha evaluado como variables resultados la gestación bioquímica, la gestación clínica y la evolutiva.

13.1 Datos epidemiológicos de las pacientes

El rango de edad de todas las pacientes incluidas en este estudio fue de 23 a 46 años. La media de edad de las pacientes que se sometieron a un tratamiento de IAH es de $33,68 \pm 2,54$ años. En el caso de las pacientes que se realizaron un FIV con sus propios ovocitos la media es de $34,66 \pm 3,05$ años. Esta media asciende a $40,22 \pm 3,51$ en el caso de las pacientes que se sometieron a una FIV con donación de ovocitos, siendo la edad media de los ovocitos utilizados para estos tratamientos de $25,16 \pm 4,15$ años (Figura 27).

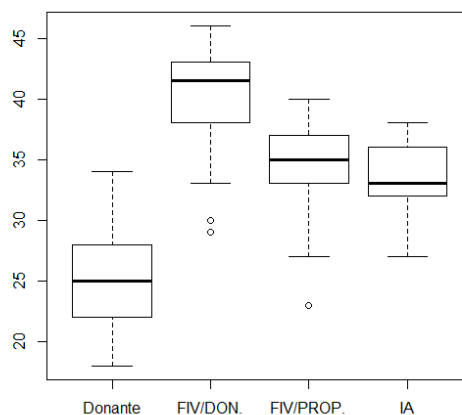


Figura 27 Diagrama de cajas en el que se muestra la distribución de edades de las pacientes y los donantes, separado por tipo de tratamiento.

13.2 Inseminación artificial

Se han analizado los resultados de 44 ciclos de IAH en este estudio. Los datos descriptivos de los resultados de dichos ciclos en su conjunto y separados por las distintas moléculas analizadas en cada uno de ellos se encuentran recogidos en la Tabla 27. Se ha de señalar que en 10 de las 44 muestras de espermatozoides se han medido dos moléculas diferentes.

Se muestran en la Tabla 27 el porcentaje de pruebas de embarazo positivas (tasa de gestación bioquímica), de presencia de latido fetal (tasa de gestación clínica) y confirmación de la correcta evolución del embarazo (tasa de gestación evolutiva), con respecto al total de inseminaciones realizadas.

	TOTAL (44)	CD84 (9)	PLA2. (32)	UBQ (13)
Tasa de gestación bioquímica	14%	11%	12%	31%
Tasa de gestación clínica	11,6%	11%	9,4%	23%
Tasa de gestación evolutiva	11,6%	11%	9,4%	23%

Tabla 27 Valores de los resultados de las TRA. Entre paréntesis se recoge el número de ciclos analizados.

13.2.1 Gestación

De los 44 ciclos se realizó la determinación en sangre de la hormona β -hCG, en los casos en que esta hormona se encontraba elevada se consideraba gestación bioquímica positiva.

Los resultados de la evaluación de la existencia de una asociación entre la presencia de las moléculas en los espermatozoides y el resultado de una IAH se recogen en la Tabla 28.

	CD84		UBQ		PLA2G2A	
	%spz	nMIF	%spz	nMIF	%spz	nMIF
SI	0,067	1,04	0,829	8,19	0,149	1,16
NO	0	0,866	0,796	3,29	0,081	1,08
P valor	0,138	0,175	0,216	0,025*	0,754	0,732

Tabla 28 Valores de las medianas de las variables estudiadas en cada una de las moléculas-porcentaje de espermatozoides positivos para la molécula (%spz) y valores normalizados de la intensidad de fluorescencia (nMIF)- en los casos en los que hubo gestación bioquímica (SI) y en los que no la hubo (NO). P valor hace referencia a la significancia estadística de la prueba estadística de Wilcoxon.

No se ha encontrado ninguna diferencia estadísticamente significativa con respecto al porcentaje de espermatozoides marcados para ninguna de las moléculas. Se ha encontrado diferencia significativa en las medianas de los valores de nMIF de **UBQ** entre los dos grupos (embarazo bioquímico si/no), siendo mayor en el caso de la gestación positiva. Es decir, la cantidad relativa de UBQ por espermatozoide es significativamente mayor en las muestras de espermatozoides que dan lugar a una prueba de embarazo positiva tras una IAH.

En las otras dos moléculas (CD84 y PLA2G2A) tampoco en la intensidad de fluorescencia se ha visto diferencia significativa.

13.2.2 Gestación clínica

Otro parámetro que mide el resultado de una TRA es la gestación clínica, entendida como la confirmación ecográfica de un embarazo mediante la presencia de latido fetal. En este estudio se ha intentado relacionar la presencia de CD84, UBQ y PLA2G2A en los espermatozoides con la consecución o no de una gestación clínica, cuyos resultados se recogen en la Tabla 29.

Tampoco se han encontrado diferencias significativas entre los grupos que consiguieron una gestación clínica y los que no lo consiguieron, cuando se valora el porcentaje de espermatozoides marcados. En cuanto a la mediana normalizada de intensidad de fluorescencia, en el caso de la evaluación de la gestación clínica, no

se ha encontrado diferencias significativas en ninguna de las tres moléculas estudiadas.

	CD84		UBQ		PLA2G2A	
	%spz	nMIF	%spz	nMIF	%spz	nMIF
SI	0,067	1,04	0,844	6,3	0,235	1,2
NO	0	0,866	0,8	3,35	0,064	1,04
P valor	0,138	0,175	0,271	0,151	0,332	0,348

Tabla 29 Valores de las medianas de las variables estudiadas en cada una de las moléculas-porcentaje de espermatozoides positivos para la molécula (%spz) y valores normalizados de la intensidad de fluorescencia (nMIF)- en los casos en los que hubo gestación clínica (SI) y en los que no la hubo (NO). P valor hace referencia a la significancia estadística de la prueba estadística de Wilcoxon.

13.2.3 Gestación evolutiva

El último parámetro evaluador del resultado de un tratamiento que tendremos en cuenta en este estudio es la consecución de una gestación evolutiva, entendiendo como tal aquella en la que en la semana 12 de gestación hay confirmación ecográfica de la correcta evolución del embarazo. Se recogieron los datos de la evolución de los embarazos en los 44 ciclos analizados en este estudio, en la Tabla 30 se recogen los resultados estadísticos de la asociación entre estos datos y la presencia de las moléculas en estudio en las muestras de espermatozoides utilizadas para los TRA.

Al igual que en los parámetros anteriores no se han encontrado diferencias significativas entre los grupos cuando observamos el porcentaje de espermatozoides positivo para cada una de las moléculas. Tampoco se han encontrado diferencias significativas en el valor de la intensidad de fluorescencia normalizado en ninguna de las tres moléculas analizadas cuando comparamos dichos valores entre el grupo que consiguió una gestación evolutiva y el grupo que no lo consiguió.

	CD84		UBQ		PLA2G2A	
	%spz	nMIF	%spz	nMIF	%spz	nMIF
SI	0,067	1,04	0,844	6,3	0,235	1,2
NO	0	0,866	0,8	3,35	0,064	1,04
P valor	0,138	0,175	0,271	0,151	0,332	0,348

Tabla 30 Valores de las medianas de las variables estudiadas en cada una de las moléculas-porcentaje de espermatozoides positivos para la molécula (%spz) y valores normalizados de la intensidad de fluorescencia (nMIF)- en los casos en los que hubo gestación evolutiva (SI) y en los que no la hubo (NO). P valor hace referencia a la significancia estadística de la prueba estadística de Wilcoxon.

13.3 FIV con ovocitos propios

En un total de 101 muestras de espermatozoides capacitadas para tratamiento de FIV con ovocitos de la propia paciente, se ha evaluado la presencia de las proteínas en estudio. En un total de 21 muestras se han analizado dos moléculas diferentes.

Se presenta los datos de aquellos ciclos en los que hubo transferencia de embriones en fresco, es decir, en el mismo ciclo en el que se realizó la estimulación ovárica, fueron un total de 66 ciclos. En los otros 35, todos los embriones fueron congelados y transferidos al útero de la paciente en ciclos posteriores tras su descongelación, o no tuvieron transferencia por ausencia de embriones viables (6 de los 35 casos).

En la Tabla 31 se muestran los datos descriptivos de los resultados de los 66 tratamientos en su conjunto y separado por las diferentes moléculas analizadas en las muestras seminales. Se recogen en la tabla el porcentaje de pruebas de embarazo positivas (tasa de gestación bioquímica), de presencia de latido fetal (tasa de gestación clínica) y confirmación de la correcta evolución del embarazo (tasa de gestación evolutiva), con respecto al total de transferencias realizadas.

	TOTAL (66)	CD84 (10)	PLA2. (36)	UBQ (37)
Tasa de gestación bioquímica	63,6%	70 %	56 %	68 %
Tasa de gestación clínica	56,1%	50 %	50 %	59 %
Tasa de gestación evolutiva	50%	50 %	42 %	54 %

Tabla 31 Valores de los resultados de las TRA. Entre paréntesis se recoge el número de ciclos analizados en total y para cada una de las moléculas.

Se ha realizado un análisis de las gestaciones acumuladas de los 101 ciclos incluidos en el estudio, teniendo en cuenta tanto las transferencias de embriones en fresco como las de embriones vitrificados/desvitrificados. Se ha definido un modelo de Possion para cada una de las variables de gestación (bioquímica, clínica y evolutivo) y para cada una de las moléculas analizadas. Entraremos en detalle en los siguientes apartados.

13.3.1 Gestación

Se evaluó la gestación mediante la determinación en sangre de la hormona β -hCG, clasificando así el resultado del tratamiento en gestación bioquímica sí o no.

En la Tabla 32 se recogen los resultados del test de sumas de Wilcoxon utilizado para evaluar la relación entre el resultado de las 66 transferencias embrionarias realizadas en tratamientos **en fresco**, con la presencia de las tres moléculas en los espermatozoides utilizados para los respectivos tratamiento.

	CD84		UBQ		PLA2G2A	
	%spz	nMIF	%spz	nMIF	%spz	nMIF
SI	0	0,897	0,756	4,56	0,027	1,04
NO	0,001	0,93	0,877	5,79	0,0905	1,08
P valor	1	0,649	0,2	0,2	0,666	0,390

Tabla 32 Valores de las medianas de las variables estudiadas en cada una de las moléculas-porcentaje de espermatozoides positivos para la molécula (%spz) y valores normalizados de la intensidad de fluorescencia (nMIF)- en los casos en los que hubo gestación bioquímica (SI) y en los que no la hubo (NO). P valor hace referencia a la significancia estadística de la prueba estadística de Wilcoxon.

No se han encontrado diferencias significativas en la presencia de UBQ, PLA2G2A ni CD84 en las muestras de espermatozoides capacitadas utilizadas para los tratamientos de FIV con ovocitos propios, entre aquellas muestras utilizadas en tratamientos que dieron lugar a una gestación bioquímica y aquellos que no lo consiguieron. En ninguna de las dos variables utilizadas para medir la presencia de dichas moléculas (porcentaje de espermatozoides positivos, cantidad relativa de molécula por espermatozoide) se encontró significancia.

Se recogen en las gráficas mostradas a continuación (Figura 28) los análisis de los resultados de todas las transferencias de embriones a las que se sometieron nuestros pacientes hasta diciembre de 2018 (**transferencias acumuladas**). Siempre embriones fruto de un único tratamiento, es decir, con la misma cohorte de ovocitos y muestra de semen.

En ninguno de los casos existe relación lineal entre la presencia de la proteína, ya sea el porcentaje de espermatozoides positivos para la molécula o la cantidad relativa de molécula por espermatozoide, y la tasa de gestación acumulada.

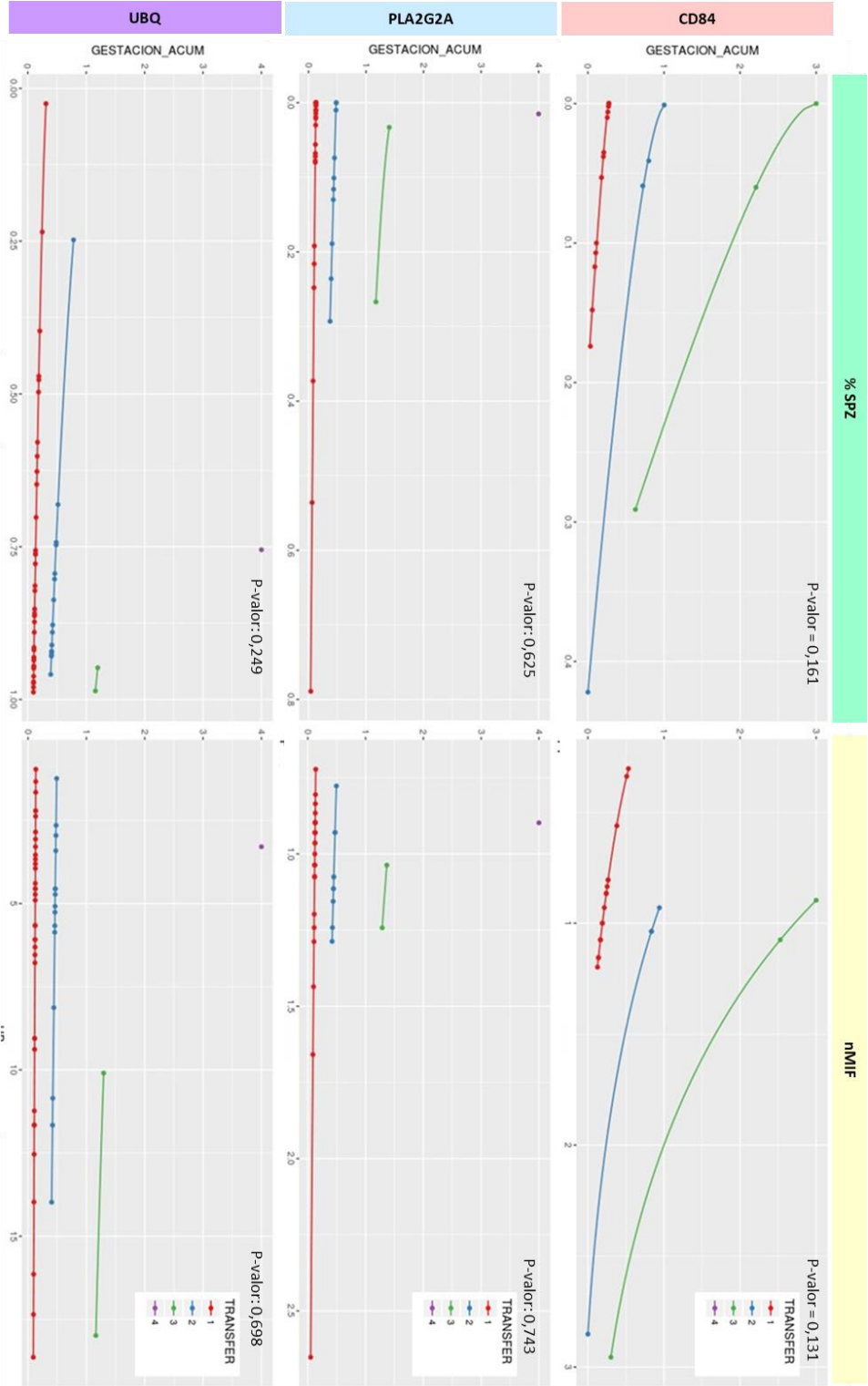


Figura 28 Representación gráfica de las gestaciones bioquímicas acumuladas de los tratamientos de FIV con ovocitos propios separados por número de transferencias acumulas (1, 2, 3 o 4). Se representan los resultados de los modelos de Poisson para cada variable evaluadora de la presencia de cada molécula (% y nMIF) junto con la significancia de cada prueba (p-valor).

13.3.2 Gestación clínica

Como en el caso anterior, la confirmación de la gestación mediante la determinación de la presencia de latido fetal fue realizada en todos ciclos evaluados. Nuevamente en la Tabla 33 que se presenta a continuación se recoge el resultado del análisis estadístico de la relación entre la consecución de una gestación clínica y la presencia de las diferentes moléculas, en los 66 tratamientos con transferencia **en fresco**

	CD84		UBQ		PLA2G2A	
	%spz	nMIF	%spz	nMIF	%spz	nMIF
SI	0	0,866	0,814	4,73	0,027	1,04
NO	0,001	0,93	0,859	5,26	0,079	1,07
P valor	1	1	0,430	0,362	0,763	0,486

Tabla 33 Valores de las medianas de las variables estudiadas en cada una de las moléculas-porcentaje de espermatozoides positivos para la molécula (%spz) y valores normalizados de la intensidad de fluorescencia (nMIF)- en los casos en los que hubo gestación clínica (SI) y en los que no la hubo (NO). P valor hace referencia a la significancia estadística de la prueba estadística de Wilcoxon.

Como se ve en la tabla, en ninguna de las tres moléculas evaluadas se detectó diferencia en su presencia en las muestras de semen, entre las parejas que tras el tratamiento conseguían una gestación clínica y las que no lo hacían.

El resultado del análisis de las **gestaciones clínicas acumuladas**, como en el caso anterior, se recoge en las gráficas expuestas a continuación (Figura 29). De la misma forma que en las gestaciones bioquímicas, tampoco existe ninguna asociación lineal entre la tasa de gestación clínica de nuestros 100 pacientes (101 ciclos) y la presencia en los espermatozoides de las moléculas estudiadas.

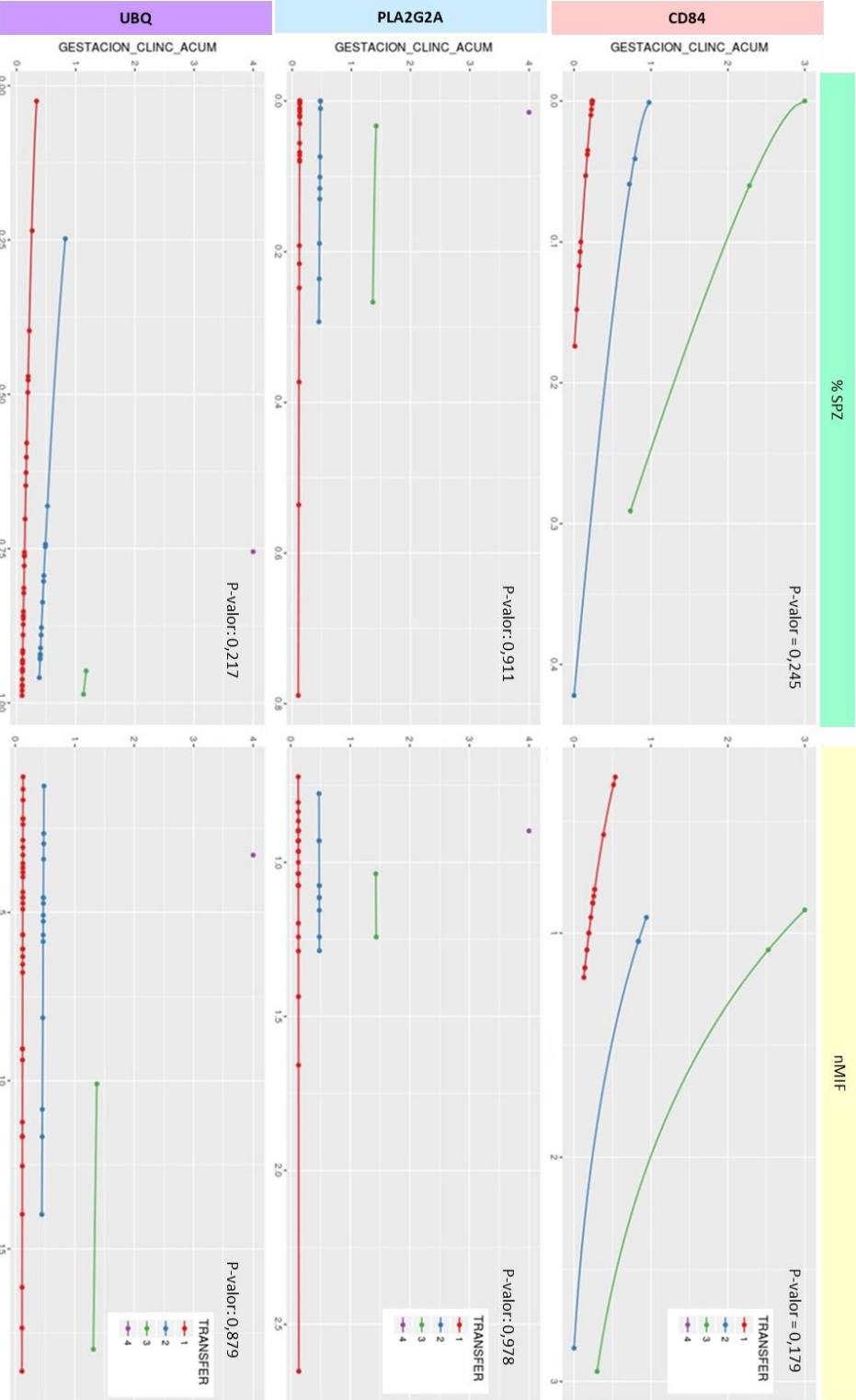


Figura 29 Representación gráfica de las gestaciones clínicas acumuladas de los tratamientos de FIV con ovocitos propios separados por número de transferencias acumulas (1, 2, 3 o 4). Se representan los resultados de los modelos de Poisson para cada variable evaluador a de la presencia de cada molécula (% y nMIF) junto con la significancia de cada prueba (p-valor).

13.3.3 Gestación evolutiva

También en este caso, en los ciclos de FIV con ovocitos propios se comprobó la evolución de la gestación en semana 12.

El análisis de los tratamientos **en fresco** se recoge en la Tabla 34. Una vez más, ni el porcentaje de espermatozoides positivos para ninguna de las tres proteínas estudiadas, ni la cantidad relativa de proteína por espermatozoide (intensidad de fluorescencia) fueron significativamente diferentes entre las muestras que eran utilizadas en un tratamiento que terminó en una gestación evolutiva y aquellas que no conseguían este éxito.

	CD84		UBQ		PLA2G2A	
	%spz	nMIF	%spz	nMIF	%spz	nMIF
SI	0	0,866	0,787	4,73	0,033	1,04
NO	0,001	0,93	0,859	5,26	0,078	1,07
P valor	1	1	0,402	0,307	0,723	0,712

Tabla 34 Valores de las medianas de las variables estudiadas en cada una de las moléculas-porcentaje de espermatozoides positivos para la molécula (%spz) y valores normalizados de la intensidad de fluorescencia (nMIF)- en los casos en los que hubo gestación evolutiva (SI) y en los que no la hubo (NO). P valor hace referencia a la significancia estadística de la prueba estadística de Wilcoxon.

En el caso de las **gestaciones evolutivas acumuladas** se reproducen los resultados de la gestación bioquímica acumulada y clínica acumulada. No encontrándose relación lineal entre la tasa de gestación evolutiva acumulada y la presencia de ninguna de las tres moléculas en los espermatozoides utilizados para el ciclo de ICSI (Figura 30).

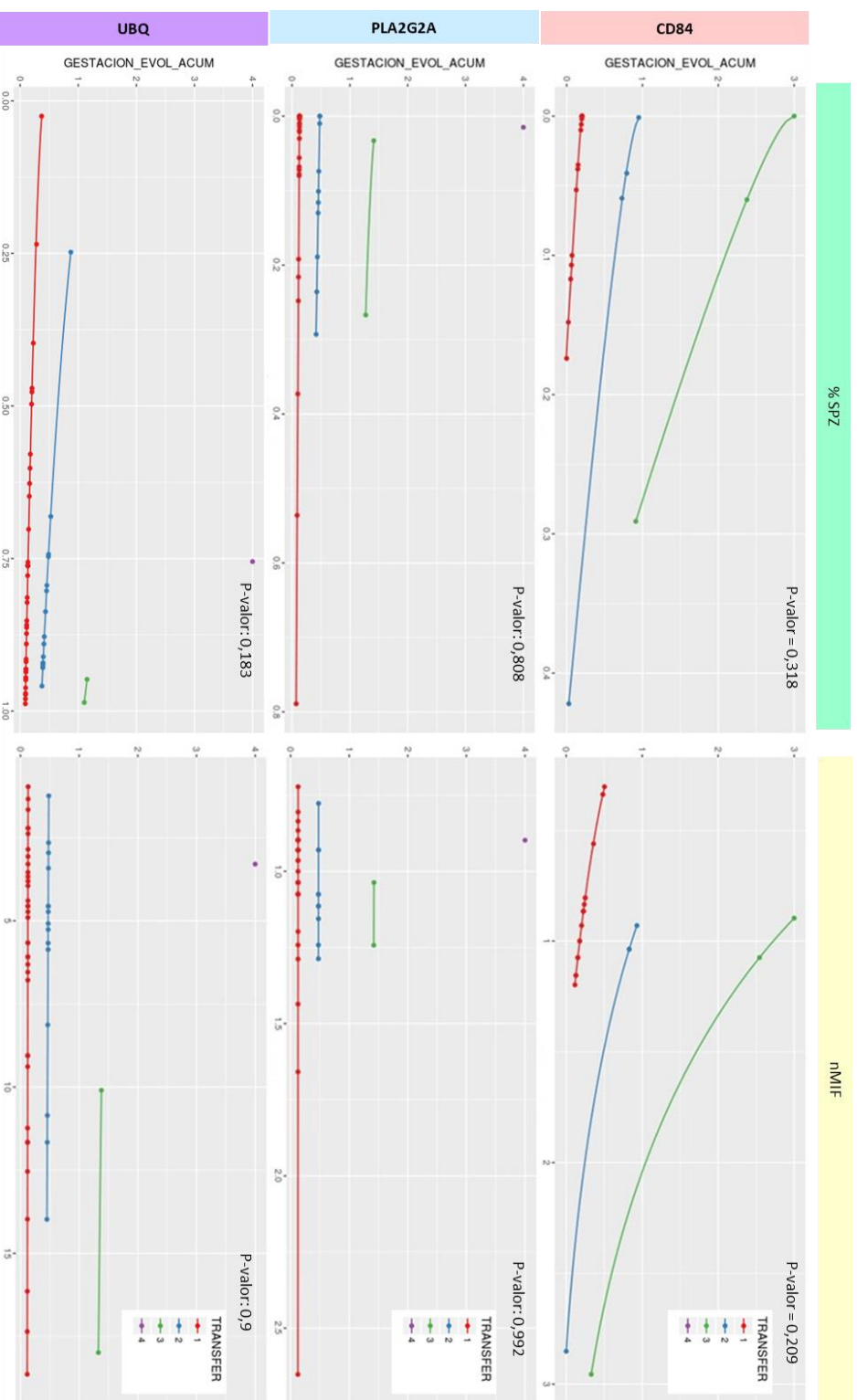


Figura 30 Representación gráfica de las gestaciones evolutivas acumuladas de los tratamientos de FIV con ovocitos propios separados por número de transferencias acumulas (1, 2, 3 o 4). Se representan los resultados de los modelos de Poisson para cada variable evaluadora de la presencia de cada molécula (% y nMIF) junto con la significancia de cada prueba (p-valor).

13.4 FIV con ovocitos donados

Se han analizado los resultados de 93 ciclos de FIV con ovocitos donados (tipo ICSI). Cabe destacar que en 32 de los 93 ciclos se han medido dos moléculas diferentes. Además, se han realizado dos tipos de análisis de resultado de los ciclos; en primer lugar se evaluó el resultado de la primera transferencia de embriones de cada paciente realizada en fresco (n=88) y en segundo lugar todas las transferencias de embriones (en fresco y congelados) que tuvieron los 93 pacientes fruto de un único tratamiento (en el que se midió la presencia de las moléculas en la muestra de semen utilizada).

Los datos descriptivos de los resultados de los ciclos en fresco, tanto en su conjunto, como separados por las distintas moléculas analizadas en cada uno de ellos, se encuentran recogidos en la Tabla 35.

	TOTAL (88)	CD84 (14)	PLA2. (57)	UBQ (49)
Tasa de gestación bioquímica	75%	93%	72 %	67%
Tasa de gestación clínica	65,9%	64%	67 %	61%
Tasa de gestación evolutiva	55,7%	50%	56 %	55%

Tabla 35 Valores de los resultados de las TRA. Entre paréntesis se recoge el número de ciclos analizados en total y para cada una de las moléculas.

Para la evaluación de los resultados acumulados se ha definido un modelo de Poisson para cada una de las variables de gestación (bioquímica, clínica y evolutivo) y para cada una de las moléculas analizadas.

13.4.1 Gestación

En todos los ciclos se realizó la determinación en sangre de la hormona β -hCG con tal de evaluar la gestación bioquímica.

En la Tabla 36 se detallan los resultados del análisis estadístico (test de sumas de Wilcoxon) realizado para determinar la asociación entre los resultados de las TRA y la presencia en espermatozoides de nuestras moléculas de interés.

	CD84		UBQ		PLA2G2A	
	%spz	nMIF	%spz	nMIF	%spz	nMIF
SI	0	0,898	0,875	5,87	0,042	1,04
NO	0,135	0,696	0,887	5,47	0,019	1,04
P valor	0,185	0,214	0,924	0,509	0,612	0,776

Tabla 36 Valores de las medianas de las variables estudiadas en cada una de las moléculas-porcentaje de espermatozoides positivos para la molécula (%spz) y valores normalizados de la intensidad de fluorescencia (nMIF)- en los casos en los que hubo gestación bioquímica (SI) y en los que no la hubo (NO). P valor hace referencia a la significancia estadística de la prueba estadística de Wilcoxon.

Como se ve en la tabla, no se ha encontrado ninguna diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de pacientes que consiguió una prueba positiva y el grupo que no lo consiguió, con respecto al porcentaje de espermatozoides marcados para ninguna de las moléculas. Tampoco se ha encontrado ninguna diferencia significativa en los valores de intensidad de fluorescencia de ninguna de las moléculas entre los dos grupos (embarazo bioquímico si/no).

Los resultados del modelo de Poisson aplicado para estudiar la tasa de **gestación acumulada** ajustada por el número de transferencias embrionarias a las que se sometieron nuestros pacientes se recogen en las gráficas presentadas a continuación (Figura 31), junto al valor del resultado del modelo y la significancia del mismo.

La presencia de ninguna de las proteínas estudiadas (ya sea expresada en porcentaje de espermatozoides con la molécula o cantidad relativa de molécula por espermatozoide), se ha encontrado que se relacione linealmente con la tasa de gestación acumulada.

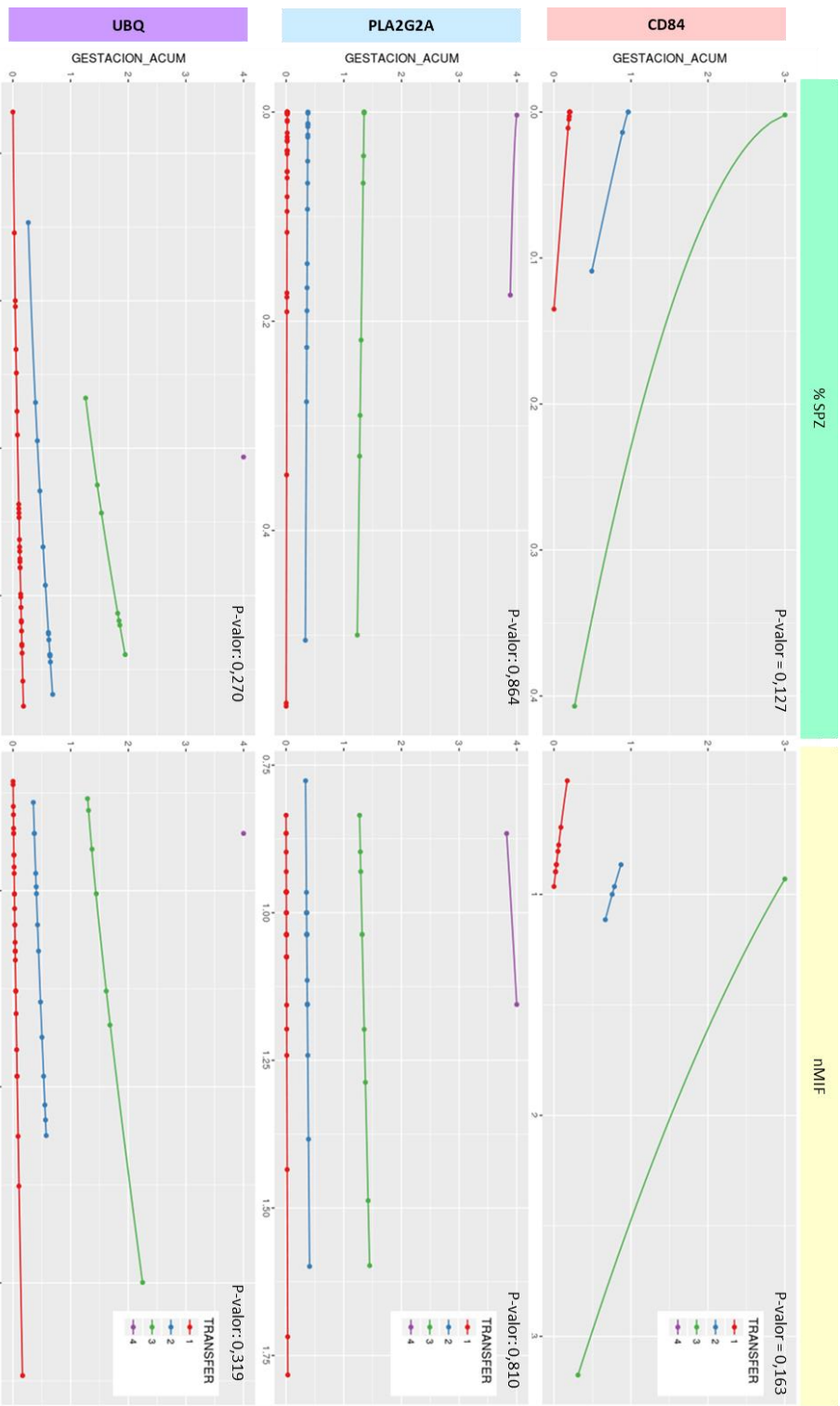


Figura 31 Representación gráfica de las gestaciones bioquímicas acumuladas de los tratamientos de FIV con ovocitos donados separados por número de transferencias acumuladas (1, 2, 3 o 4). Se representan los resultados de los modelos de Poisson para cada variable evaluada de la presencia de cada molécula (% y nMIF) junto con la significancia de cada prueba (p-valor).

13.4.2 Gestación clínica

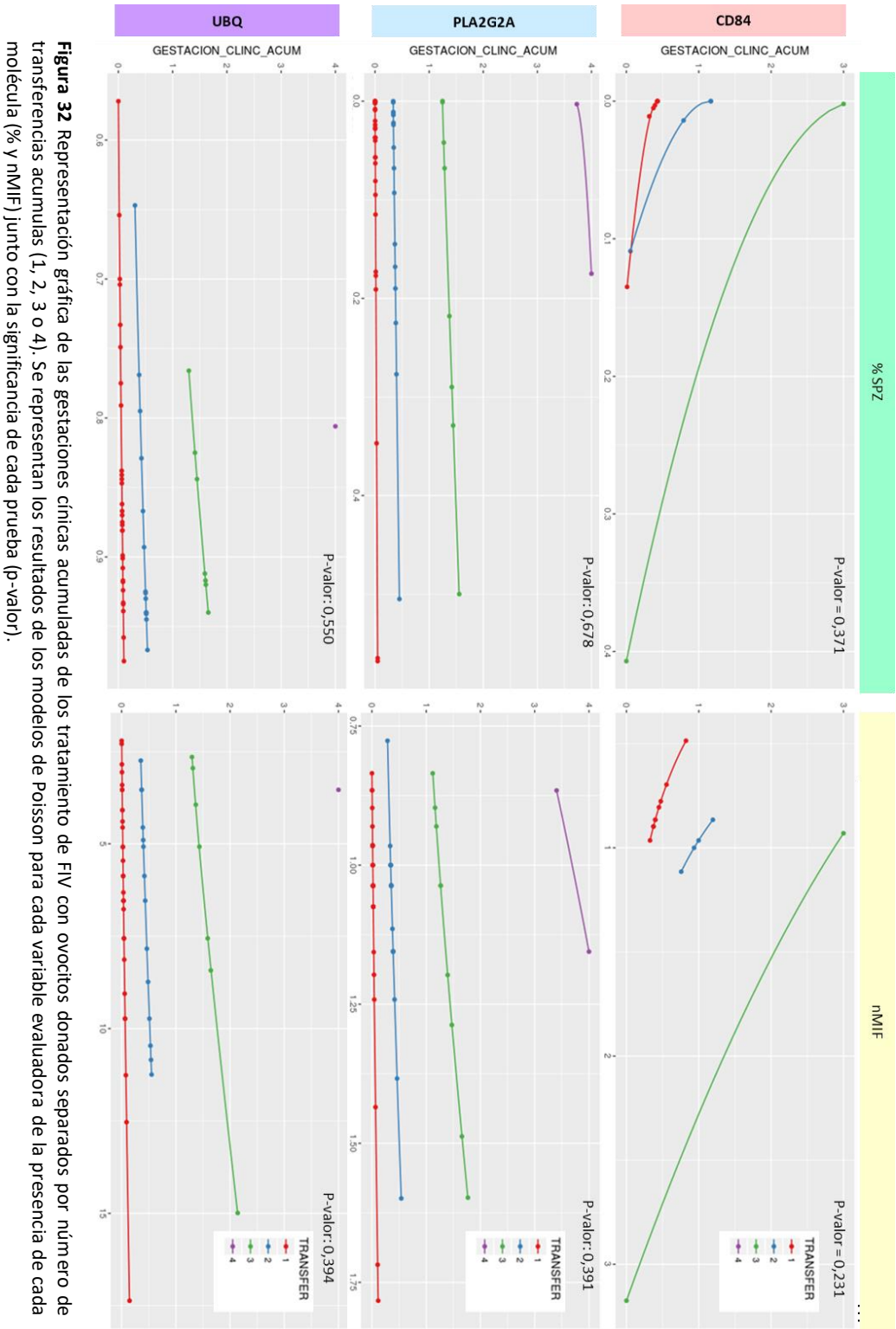
Se evaluó la gestación clínica en ciclos de FIV con ovocitos donados, siguiendo la misma metodología que en los casos anteriores. Igualmente, en la Tabla 37 se recogen los resultados estadísticos del análisis de la relación entre el resultado de las transferencias **en fresco** y la presencia de PLA2G2A, CD84 y UBQ en los espermatozoides.

No se han encontrado diferencias significativas entre los pacientes que tras una primera transferencia de un ciclo de FIV con ovocitos donados consiguen una gestación clínica y los que no la consiguen. En términos de presencia de alguna de las tres moléculas en estudio, en las muestras de espermatozoides capacitados para ese tratamiento, ya sea evaluando el porcentaje de espermatozoides positivos para cada molécula o la presencia de molécula por unidad celular (intensidad de fluorescencia).

	CD84		UBQ		PLA2G2A	
	%spz	nMIF	%spz	nMIF	%spz	nMIF
SI	0	0,865	0,869	5,87	0,057	1,04
NO	0,002	0,93	0,899	5,08	0,014	1,04
P valor	0,477	0,894	0,492	0,712	0,204	0,274

Tabla 37 Valores de las medianas de las variables estudiadas en cada una de las moléculas-porcentaje de espermatozoides positivos para la molécula (%spz) y valores normalizados de la intensidad de fluorescencia (nMIF)- en los casos en los que hubo gestación clínica (SI) y en los que no la hubo (NO). P valor hace referencia a la significancia estadística de la prueba estadística de Wilcoxon.

Tampoco se ha encontrado ninguna asociación lineal entre la presencia de las moléculas en estudio y el **resultado acumulado** (gestación clínica) de todas las transferencias embrionarias realizadas por nuestros pacientes de un único tratamiento de FIV con ovocitos donados. Los datos se recogen en las gráficas que se muestran a continuación (Figura 32).



13.4.3 Gestación evolutiva

También en los 93 ciclos se evaluó la evolución de los embarazos en semana 12 mediante ecografía. Se recogen en la Tabla 38 los resultados del pertinente análisis estadístico para comparar la presencia de las moléculas en las muestras de espermatozoides, con el resultado de las TRA para las que se utilizaron.

	CD84		UBQ		PLA2G2A	
	%spz	nMIF	%spz	nMIF	%spz	nMIF
SI	0	0,865	0,875	6,32	0,041	1,04
NO	0,002	0,93	0,887	5,08	0,024	1,04
P valor	0,413	0,565	0,825	0,377	0,942	0,828

Tabla 38 Valores de las medianas de las variables estudiadas en cada una de las moléculas-porcentaje de espermatozoides positivos para la molécula (%spz) y valores normalizados de la intensidad de fluorescencia (nMIF)- en los casos en los que hubo gestación evolutiva (SI) y en los que no la hubo (NO). P valor hace referencia a la significancia estadística de la prueba estadística de Wilcoxon.

Tampoco se han encontrado diferencias significativas en la presencia de las diferentes moléculas analizadas en las muestras de espermatozoides de parejas que se sometieron a un tratamiento de FIV con ovocitos donados entre aquellas que consiguieron una gestación evolutiva y las que no lo hicieron.

Tampoco el modelo de Poisson en este caso dio como resultado ninguna asociación significativa entre las moléculas y el resultado de todas las transferencias embrionarias **acumuladas** realizadas por nuestros pacientes (Figura 33).

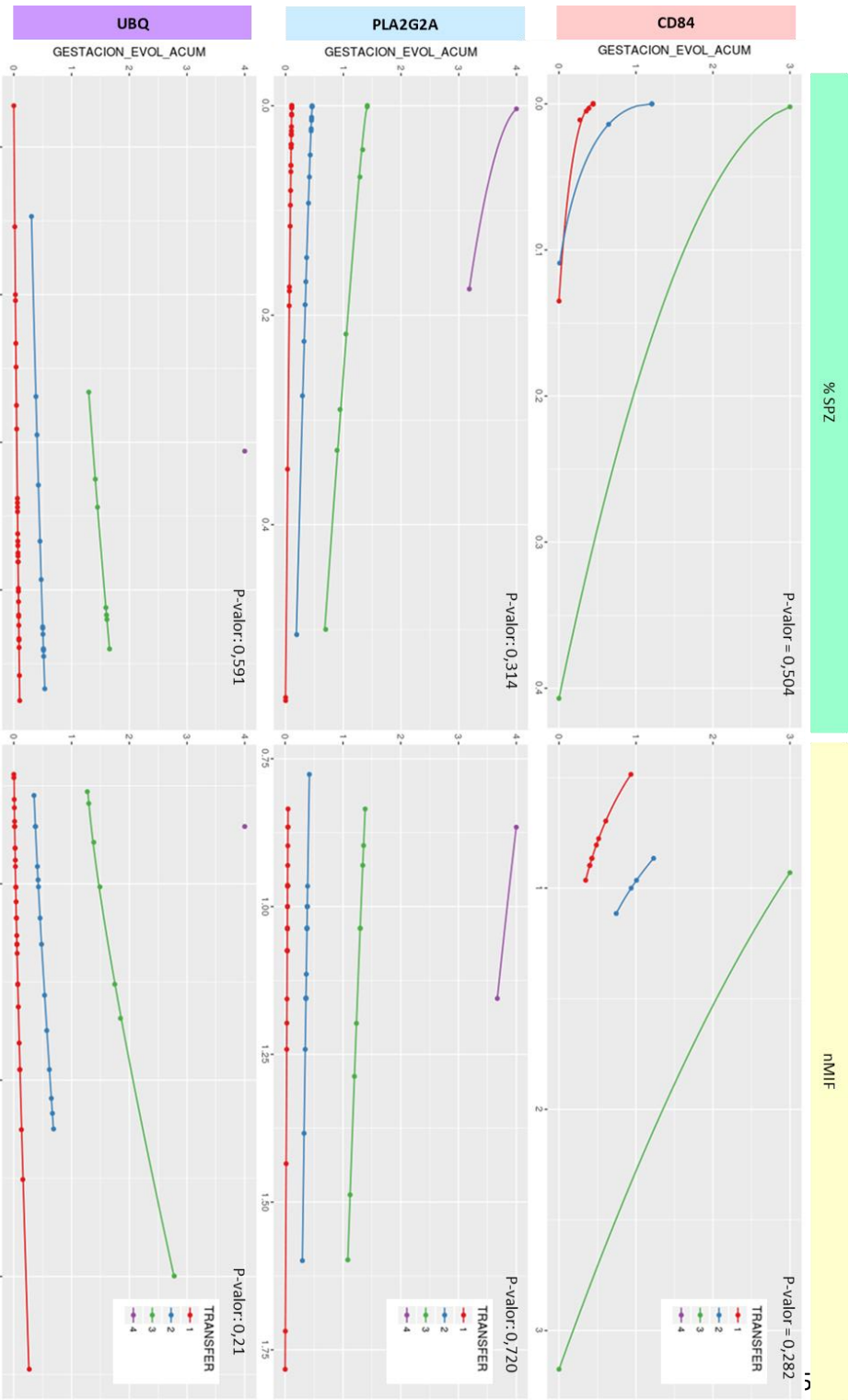


Figura 33 Representación gráfica de las gestaciones evolutivas acumuladas de los tratamientos de FIV con ovocitos donados separados por número de transferencias acumuladas (1, 2, 3 o 4). Se representan los resultados de los modelos de Poisson para cada variable evaluada en la presencia de cada molécula (% y nMIF) junto con la significancia de cada prueba (p-valor).

14. OBJETIVO 2: Separación de las muestras en función de la presencia de las moléculas.

5.1. Evaluación de las muestras de semen.

Separación en función de la presencia de PLA2G2A

La media de la concentración y la movilidad progresiva en las muestras en fresco fue de $86,29 \pm 45,87$ mill/ml y $45,42 \pm 13,69$ % y tras su capacitación fueron $43,91 \pm 16,85$ mill/ml y $73,92 \pm 5,33$ %. En la Tabla 39 que se presenta a continuación se recogen los datos descriptivos de las fracciones positivas y negativas y el resultado del test de t- student para muestras apareadas. El resultado de dicho test revela que las variables seminales de concentración y movilidad progresiva son diferentes entre ambas fracciones.

	Fracción positiva	Fracción negativa	p-valor
Concentración (mill/ml)	$8,025 \pm 3,145$	$24,175 \pm 7,769$	$1,649e-06^{**}$
Progresivos (%)	$59,750 \pm 12,084$	$71,167 \pm 8,932$	$0,01615^{*}$

Tabla 39 Se muestra la media \pm la desviación estándar de la concentración y el porcentaje de móviles progresivos en las dos fracciones obtenidas tras la separación con MACS-PLA2G2A. También se recoge la significancia del test t-student comparando dichas medias.

Separación en función de la presencia de UBQ

La media de la concentración y del porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva en los eyaculados (previo a la capacitación) fue de $54,80 \pm 26,71$ mill/ml y $47,94 \pm 10,64$ %. Tras la capacitación de la muestra mediante la técnica de *swim up* la media de la concentración de espermatozoides fue de $10,13 \pm 6,66$ mill/ml y la movilidad progresiva media de $73,25 \pm 13,37$ %. Los datos descriptivos de la movilidad espermática tras la separación por MACS se recogen en la Tabla 40, así como el resultado del test t-student para muestras apareadas.

La distribución de ambas fracciones en lo que ha concentración y movilidad progresiva se refiere, son muy significativamente diferentes.

	Fracción positiva	Fracción negativa	p-valor
Concentración (mill/ml)	7,800±4,473	22,581±8,494	1,076e-08**
Progresivos (%)	57,688±12,279	64,688±11,563	0,005491**

Tabla 40 Se muestra la media \pm la desviación estándar de la concentración y el porcentaje de móviles progresivos en las dos fracciones obtenidas tras la separación con MACS-UBQ. También se recoge la significancia del test t-student comparando dichas medias.

5.2. Valoración de la eficiencia de la separación.

Separación en función de la presencia de PLA2G2A

La expresión relativa del gen de la proteína PLA2G2A en la fracción positiva con respecto a la negativa, en los cuatro pooles, se recoge en la Figura 34. Se muestra la tasa de cambio de la expresión del gen, normalizado por el gen de la β -actina, al aplicar el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

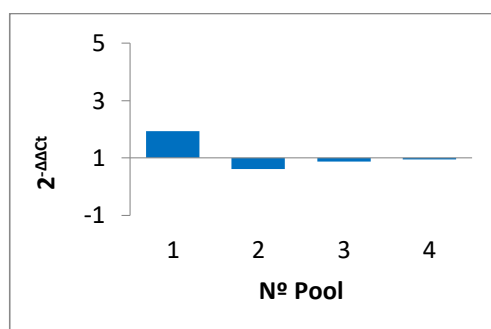


Figura 34 Tasa de cambio en la expresión del ARNm de PLA2G2A entre las fracciones positivas y negativas tras separación de espermatozoides por MACS.

En tres casos fue inferior a 1 pero muy próximo a este valor, es decir, no se daba un incremento en la cantidad de espermatozoides que presentaban este transcrito en la fracción positiva con respecto a la negativa. Únicamente en un pool se encuentra casi el doble de transcrito en la fracción positiva que en la negativa.

Separación en función de la presencia de UBQ

En la Figura 35 se muestra la expresión relativa del gen de la proteína UBQ en la fracción positiva de la selección con MACS respecto a la fracción negativa, analizado con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y normalizado por el gen de la β -actina.

En el caso de la separación por UBQ en todos los pooles se consiguió en la fracción positiva mayor cantidad de transcrito de esta molécula en la fracción positiva que en la negativa.

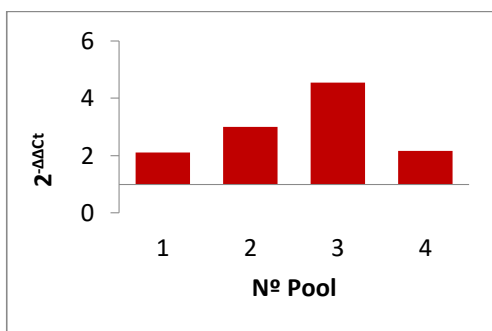


Figura 35 Tasa de cambio en la expresión del ARNm de UBQ entre las fracciones positiva y negativa tras separación de espermatozoides por MACS.

Discusión

Hoy en día y a pesar de los avances conseguidos continuamente en el campo de la fertilidad, existe todavía una gran capacidad de mejora en algunos aspectos:

- Todavía, en el 10-20% de los casos de infertilidad, el conocimiento disponible hasta la fecha no permite explicar la causa de dicha infertilidad, dándoles a estas parejas como único diagnóstico el de infertilidad de origen desconocido o idiopática (ESHRE 2017).
- La tasa de éxito de los tratamientos de reproducción asistida, a pesar de que varía mucho dependiendo del tipo de técnica aplicada, en el “mejor” de los tratamientos con gametos de la propia pareja la tasa de gestación por transferencia es del 36,3%, ascendiendo a 54,5% con ovocitos donados (Sociedad Española de Fertilidad, SEF 2017). Es decir, todavía nos encontramos muy lejos del 100% de eficacia.

Por ello es necesario que se continúe investigando en la mejora de estos aspectos. Los biomarcadores moleculares basados en la fisiología de los espermatozoides son un interesante punto de partida para estos posibles avances, ya que poder definir cuáles son las moléculas que hacen a un espermatozoide fisiológicamente competente, nos haría capaces de diagnosticar mejor (Kovac et al. 2013) y de mejorar los resultados de las técnicas de reproducción asistida seleccionando aquellos espermatozoides con las características moleculares de un espermatozoide capaz de dar lugar a una gestación (Said et al. 2006, Sakkas et al. 2015).

En esta línea se encuentra el presente proyecto de tesis con tres propuestas como posibles biomarcadores de competencia espermática: CD84, PLA2G2A y UBP, cuya valía evaluaremos en este apartado a la luz de los resultados obtenidos en los experimentos.

15. Objetivo 1. Evaluación de la presencia de las moléculas estudiadas en la membrana espermática.

15.1 Relacionar las tres moléculas estudiadas en los espermatozoides con los parámetros seminales.

Con la intención de encontrar marcadores moleculares de calidad seminal, se ha intentado, en primer lugar, buscar y definir si existe alguna relación entre nuestras tres propuestas moleculares y la calidad del semen. Dicha calidad ha sido evaluada en base a los parámetros que la OMS establece como básicos para diagnosticar una muestra de semen; volumen, concentración, movilidad y morfología (World Health Organization. 2010).

En el presente estudio no se ha incluido el parámetro de la morfología por considerarse el más subjetivo y difícil de evaluar, puesto que está sujeto únicamente a la valoración visual de la similitud de cada espermatozoide con las características definidas como normales por la OMS (World Health Organization. 2010), en general poco precisas, por parte del personal del laboratorio. Por lo que se consideró que la variabilidad era demasiado grande para ser asumida por este estudio. Además, el valor pronóstico de este parámetro en cuanto a la capacidad del espermatozoide para ejecutar su función es un tema comprometido y todavía en discusión (Boyle et al. 1992, Garcia-Vazquez et al. 2016, Kovac et al. 2017, Soler et al. 2005).

También se han tenido en cuenta los parámetros seminales después de la capacitación, concretamente; la concentración y la movilidad. En este caso tampoco se ha evaluado el volumen, puesto que dependiendo de la TRA a realizar la capacitación es diferente y concretamente en el caso de la capacitación para IA, el volumen de inseminación es siempre constante e igual a 0,5ml en los protocolos

llevados a cabo en nuestros centros, por lo que a nuestro juicio carece de interés buscar su relación con la presencia de las moléculas analizadas.

El objetivo de este apartado consiste en buscar si existen las relaciones explicadas, para identificar las moléculas que están presentes en los espermatozoides de muestras con las mejores características y poder establecer, en último término, un método diagnóstico más objetivo que ayude al espermiograma a dar un diagnóstico de la infertilidad masculina más preciso, disminuyendo a su vez el número de casos de infertilidad de origen desconocido.

CD84

La presencia de esta molécula en la superficie de los espermatozoides se evaluó midiendo el porcentaje de espermatozoides que presentaban CD84 y la intensidad de fluorescencia de la muestra que hace referencia a la cantidad relativa de molécula presente en cada célula, en este caso en cada espermatozoide.

De esta forma se determinó que no existe ninguna relación lineal entre la presencia de CD84 en los espermatozoides, ya sea en el porcentaje de espermatozoides marcados ni en la cantidad relativa de molécula por célula, con los parámetros seminales evaluados en este estudio (ya sea en la muestra en fresco como en la muestra capacitada).

Cabe señalar el pequeño porcentaje de células positivas para esta molécula, con una media de aproximadamente del 5% de los espermatozoides de una muestra. Además, en el 37% de los casos analizados no se encontró ningún espermatozoide marcado para esta molécula y en aproximadamente un 59% de las muestras analizadas el marcaje fue inferior al 1%. A la luz de estos datos y unidos al tamaño muestral limitado (N=50) de nuestro estudio, nos parece importante la verificación

de la presencia del CD84 mediante otra técnica de detección de proteínas, como Western Blot u otras técnicas de inmunofluorescencia.

Si a pesar de las limitaciones comentadas de nuestro estudio, concluimos que la presencia de esta molécula en los espermatozoides es anecdótica y puesto que no existe en la bibliografía hasta el momento artículos al respecto de la presencia de esta molécula en espermatozoides, la única referencia a la presencia del transcrito de esta proteína, que no a la proteína en sí misma, en los espermatozoides, se encuentra en los estudios de García-Herrero y colaboradores (Garcia-Herrero 2012).

Por ello se podría concluir que como en la mayoría de los transcritos encontrados en espermatozoides maduros, no hay evidencias de la presencia en los espermatozoides de las proteínas para las que codifican dichos mensajeros (Dadoune et al. 2005).

Sin embargo, y debido a que en nuestro estudio más del 50% de las muestras presentaban al menos una pequeña proporción de espermatozoides marcados, se ha intentado verificar a nivel de proteína, la relación directa que Garcia-Herrero y colaboradores habían encontrado entre el transcrito de CD84 y el resultado de las TRA (Garcia-Herrero 2012). En los apartados siguientes se hará referencia a estos resultados.

PLA2G2A

Al igual que en el caso anterior se evaluó la relación de la presencia de PLA2G2A con los parámetros de volumen, concentración y movilidad de las muestras de semen en fresco y con la concentración y la movilidad de las muestras capacitadas.

Nuevamente la presencia de PLA2G2A se examinó tanto mediante el porcentaje de espermatozoides positivos para esta molécula, como mediante la cantidad relativa de molécula en cada espermatozoide (intensidad de fluorescencia).

Del mismo modo que en el caso anterior, no se ha encontrado ninguna relación lineal entre la presencia de la PLA2G2A y la calidad seminal en fresco. Sin embargo, en el caso de la concentración y la movilidad de los espermatozoides en la muestra procesada si se encuentran relaciones significativas con la presencia de PLA2G2A.

Concretamente se ha descrito una relación lineal e inversa entre la presencia de PLA2G2A (tanto el porcentaje de espermatozoides con esta molécula, como la cantidad relativa de molécula por espermatozoide) y la concentración de espermatozoides en el capacitado para tratamientos de FIV. Además, ambas variables de presencia de la molécula se han relacionado de manera directa con el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y de manera negativa con el porcentaje de inmóviles, de nuevo, esta relación únicamente se encuentra en las muestras capacitadas para FIV (no así en las capacitadas para IA).

Esta diferencia en los resultados, representados visualmente en la Figura 19 y Figura 20, indica que el tipo de capacitación afecta al recuento de espermatozoides en la muestra procesada, así como a la movilidad de los mismos. Lo cual concuerda con el propósito diferente de cada tipo de capacitación, en los tratamientos de FIV interesa tener los mejores y más móviles espermatozoides en detrimento de la concentración, ya que únicamente es necesario un espermatozoide por ovocito (en el caso del ICSI). No ocurre lo mismo en las inseminaciones donde interesa tener el máximo de espermatozoides móviles progresivos posibles (Matorras and Hernández 2007).

A la luz de los resultados de los análisis en fresco y en el capacitado ajustado por tipo de capacitación, nos parece interesante estudiar la presencia de esta molécula en las muestras antes de capacitar, con la intención de verificar una posible teoría que explicaría los resultados obtenidos hasta el momento.

Esta teoría plantea que entre muestras con concentraciones similares en fresco capacitan peor aquellas que tienen un porcentaje mayor de espermatozoides con PLA2G2A. Esto explicaría nuestros resultados: no existe asociación entre la concentración en fresco y la presencia de la molécula en el capacitado, sin embargo, si la hay (inversa) con la concentración en el capacitado.

La PLA2G2A actuaría dificultando la capacitación, por lo que los espermatozoides con PLA2G2A en su membrana y de ellos los que mayor cantidad de la molécula tienen, presentarían mayor dificultad para vencer las barreras de la capacitación, lo que supondría que muestras que en fresco tienen mayor presencia de PLA2G2A consiguen tras capacitar menos espermatozoides, pero de ellos un porcentaje más alto presenta la molécula y la tienen en mayor cantidad.

Esta teoría también explicaría que cuando se llevan a cabo capacitaciones más “ligeras”, como el swim-up, dónde se consigue un mayor número de espermatozoides, encontraremos mayor cantidad de espermatozoides con PLA2G2A que en las muestras capacitadas con métodos más restrictivos (Tabla 11), ya que la dificultad de paso es menor. En estos casos no se encuentre ningún tipo de asociación entre concentración presencia de PLA2G2A (Figura 36).

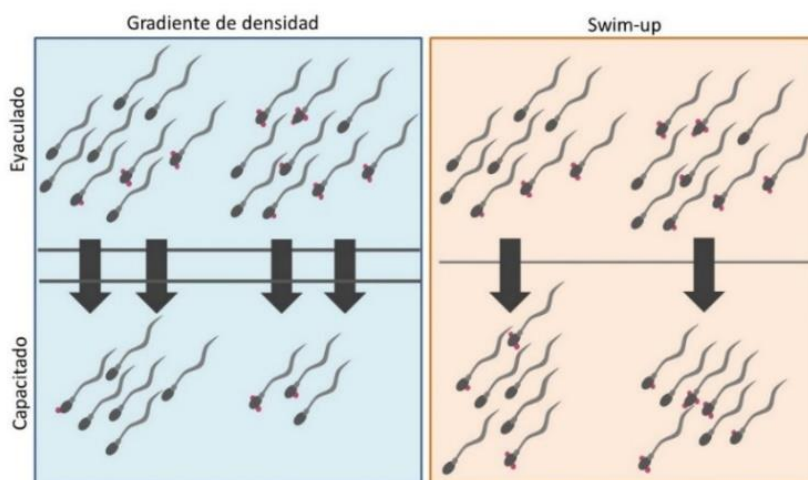


Figura 36. Dibujo esquemático de la teoría que propone a la PLA2G2A (●) como marcador de mala capacitación seminal (baja concentración).

Existen pocos estudios que busquen una asociación entre las PLA2 y las características seminales y las conclusiones son diversas. Por un lado, el grupo de Anfuso y colaboradores describen una relación directa entre la expresión de algunas PLA2 en espermatozoides humanos y la movilidad de los mismos (Anfuso et al. 2015). Sin embargo, Sarsaifi y colaboradores en un estudio realizado con semen de toro, aunque refieren la presencia de PLA2 en espermatozoides, no encuentran diferencias en la expresión de dichas moléculas entre muestras de semen de baja y alta calidad (Sarsaifi et al. 2015). No obstante, ninguno de estos trabajos estudia concretamente la proteína de la presente tesis, PLA2G2A.

Por lo tanto, a la luz de estos primeros resultados, en los que las asociaciones encontradas no son robustas o consistentes (coeficiente de determinación pequeño), se necesitan más estudios que verifiquen el posible papel de esta molécula, planteado por primera vez en este estudio, en la capacitación seminal.

UBQ

En último lugar, la presencia de UBQ se examinó mediante la valoración del porcentaje de espermatozoides positivos para esta molécula y la cantidad relativa de molécula por cada espermatozoide (intensidad de fluorescencia).

El análisis de las muestras en fresco dio como resultado global una asociación positiva entre la presencia de UBQ y los parámetros de buena calidad seminal (datos detallados en el apartado de resultados).

La bibliografía sobre esta relación es mucho más extensa que en el caso de las otras moléculas, aunque tampoco es muy concluyente por presentar resultados muy variados. Mientras que hay estudios que describen una correlación negativa entre el nivel de ubiquitinación y la morfología de los espermatozoides (Hodjat et al. 2008, Sutovsky et al. 2002, 2004), el recuento espermático (Hodjat et al. 2008, Sutovsky et al. 2004) y la movilidad progresiva (Hodjat et al. 2008, Sutovsky et al. 2004), otros grupos se encuentran en la línea de nuestros resultados, describiendo una asociación positiva (Muratori et al. 2005). Por último, también hay estudios en los que no se encuentra una correlación lineal entre el porcentaje de espermatozoides con UBQ y los parámetros básicos del semen (Eskandari-Shahraki et al. 2013, Varum et al. 2007), pero si describen una asociación negativa entre la intensidad de fluorescencia de las muestras y la concentración (Eskandari-Shahraki et al. 2013, Varum et al. 2007) la movilidad y la morfología (Varum et al. 2007).

Se ha de tener en cuenta que la mayoría de los estudios nombrados previamente analizan la presencia de la UBQ en la muestra en fresco (Eskandari-Shahraki et al. 2013, Hodjat et al. 2008, Muratori et al. 2005, Sutovsky et al. 2004, Varum et al. 2007) y sin embargo en nuestro estudio se evaluó tras su capacitación.

La capacitación es un proceso que se ha visto que afecta a la ubiquitinación de los espermatozoides, Zarei-Kheirabadi y colaboradores encuentran un aumento en el porcentaje de UBQ tras la capacitación (Zarei-Kheirabadi et al. 2012).

Eskandari y colaboradores proponen que existan dos modelos de ubiquitinación en los espermatozoides, con funciones diferentes, antes y después de la capacitación. Siendo la UBQ antes de la capacitación marcador de deficiencias espermáticas y la que se encuentra en los espermatozoides tras la capacitación tenga un papel fisiológico en la interacción entre ovocito y espermatozoide (Eskandari-Shahraki et al. 2013).

Este último argumento encaja con nuestros resultados post-capacitación. Nuestros análisis han descrito una relación positiva entre los parámetros de movilidad seminal post-capacitación y el porcentaje de espermatozoides con UBQ. De este modo, debido al papel fisiológico que pueda tener la UBQ, según Eskandari, tras la capacitación es lógico que esta molécula se encuentre en mayor cantidad en las muestras de mayor calidad (mayor movilidad).

Por otro lado, Muratori y colaboradores en su estudio de 2005, proponen una explicación a que sus resultados (asociación positiva tanto entre el porcentaje de espermatozoides con UBQ y los parámetros seminales, como entre la intensidad de fluorescencia de la muestra y la morfología y concentración de la muestra en fresco) sean contrarios a los de otros grupos. Dicho argumento sostiene que en los resultados presentados por Sutovsky y colaboradores son en realidad un artefacto provocado por unos “cuerpos redondos” presentes en muestras de semen total. Estos “cuerpos redondos” sin material nuclear, que también son ubiquitinados, se encuentran en mayor proporción en muestras de pacientes con oligoastenoteratozoospermia (Muratori et al. 2004) y son por ello, los responsables

de la relación inversa entre la ubiquitinación y la calidad seminal (Muratori et al. 2005, 2007).

Este grupo, aunque mide la presencia de UBQ en las muestras en fresco, previamente les realiza un doble lavado con medio HTF (*Human Tubal Fluid*) para retirar los “cuerpos” ubiquitinados, este lavado podría ser equiparable a nuestra capacitación en el sentido de que retiramos esos “cuerpos” confundidores.

Por lo tanto, nuestros resultados están en la línea de apoyar la UBQ como marcador de buena calidad seminal. Para una conclusión más robusta serían necesarios más estudios con un tamaño muestral mayor, ya que nuestros resultados han demostrado no ser muy consistentes (coeficiente de determinación pequeño).

Nos parece interesante señalar, la variabilidad que presentan los estudios en cuanto a la media del porcentaje de espermatozoides positivos para la UBQ: $3,41 \pm 0,99$ (Eskandari-Shahraki et al. 2013); $69,8 \pm 17,9$ (Muratori et al. 2005); $68,4 \pm 20,1$ en una población normozoospermica (Varum et al. 2007). A pesar de que, sorprendentemente, los protocolos llevados a cabo son muy similares, ya que están basados en un estudio concreto (Sutovsky et al. 2001b); utilizando el mismo anticuerpo, fijación, etc.

La media resultante de nuestro estudio asciende al $80,8 \pm 17,9$ %, por encima de la mayoría de los estudios (se aplicó también el protocolo de Sutovsky). Aunque, como ya hemos comentado, se ha demostrado un aumento de la ubiquitinación de los espermatozoides tras la capacitación; los resultados de Zarei-Kheirabadi antes de la capacitación fueron de $4,64 \pm 1,02$ % y tras la capacitación de $8,85 \pm 1,80$ % (Zarei-Kheirabadi et al. 2012). También el grupo de Ozanon y colaboradores, cuyo análisis de la presencia de UBQ se realizó post-capacitación, presenta una media del porcentaje de espermatozoides ubiquitinados del $4,0 \pm 0,8$ %, en el grupo de pacientes con mayor ubiquitinación (factor masculino) (Ozanon et al. 2005).

Por lo tanto, podemos concluir que sutiles cambios en el procesado de las muestras previo al marcaje de la UBQ -lavado (Eskandari-Shahraki et al. 2013, Muratori et al. 2005, Varum et al. 2007), capacitación (Ozanon et al. 2005, Zarei-Kheirabadi et al. 2012), congelación (Ozanon et al. 2005, Sutovsky et al. 2001b), entre otros- o en el protocolo de inmunomarcaje para citometría de flujo, pueden dar grandes variaciones en la detección de espermatozoides con UBQ en su membrana.

Por lo tanto y debido a las controversias expuestas en este apartado y al limitado valor de nuestro estudio, consideramos pertinente la realización de más estudios con un tamaño muestral mayor y comparando la presencia de la UBQ en muestras en fresco y tras su capacitación.

15.2 Relacionar las tres moléculas estudiadas en los espermatozoides con los resultados de la calidad de los embriones generados tras ICSI.

Otra manera de valorar la calidad espermática es valorar la calidad de los embriones generados con esos espermatozoides, lo que se relaciona directamente con la capacidad de ese embrión para dar lugar a una prueba de embarazo positiva (ASEBIR. 2015).

Puesto que los embriones son fruto de dos entidades diferentes; el ovocito y el espermatozoide y que en este proyecto nos centramos en la influencia que tiene el espermatozoide en el embrión, se ha intentado estandarizar al máximo la calidad ovocitaria con los criterios de inclusión/exclusión. Con la misma intención, se han analizado por separado los embriones procedentes de ovocitos propios y los procedentes de ovocitos donados.

La calidad embrionaria se ha medido de tres formas; la cantidad de embriones de embriones con calidad sufriente para ser transferidos al útero materno o

criopreservados (embriones viables) frente a los embriones bloqueados, degenerados o de calidad insuficiente (embriones no viables), dentro del grupo de embriones de una pareja (cohorte embrionaria).

En segundo lugar, se han evaluado en el día 3 de desarrollo embrionario algunas de las características que se han relacionado con el poder de implantación de un embrión: número de células, fragmentación y simetría (ALPHA Scientists In Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group Embryology 2011, ASEBIR. 2015).

En tercer y último lugar, se ha evaluado el desarrollo embrionario avanzado, es decir, en los días 5 y 6 post ICSI. Como ya se ha explicado únicamente se tendrá en cuenta el ritmo de evolución, valorando para ello la no llegada a blastocisto (embriones no evolutivos y mórulas compactas) y el estadio de desarrollo de los blastocistos (BT, BC, BE, BHi y BH) (Machtinger and Racowsky 2013).

Estas variables se han relacionado con la presencia de nuestras moléculas en las muestras de espermatozoides utilizadas para la generación de los embriones posteriormente evaluados en función de dichas variables.

CD84

Para evaluar la posible influencia de CD84 en la calidad y desarrollo de los embriones, se ha analizado el porcentaje de espermatozoides que presentaban CD84 en su membrana y la cantidad media relativa en cada espermatozoide de la muestra capacitada, la cual fue utilizada para la generación de los embriones.

En este caso, tampoco se ha encontrado ninguna relación entre la presencia de CD84 en las muestras espermáticas y la probabilidad de tener embriones viables en una cohorte embrionaria, ni con los parámetros de calidad en el desarrollo

temprano de los embriones (día +3), es decir, la presencia de esta molécula no afecta al desarrollo embrionario temprano.

Sin embargo, si se ha encontrado una asociación significativa entre el porcentaje de espermatozoides con CD84 y el estadio de desarrollo de los blastocistos en día 5 de desarrollo procedentes, únicamente, de tratamiento con ovocitos propios. La misma tendencia se ha encontrado con la intensidad de fluorescencia de la muestra.

Estos resultados podrían llevar a proponer a esta molécula como posible marcador predictivo de la llegada a blastocisto, sin embargo, el hecho de que la probabilidad de tener embriones viables no aumente con la presencia de CD84 en los espermatozoides, lleva a pensar que estos blastocistos que alcanzan el día 5 altamente desarrollados, no tengan calidad suficiente para ser transferidos o congelados (embriones viables).

Además, se ha de tener en cuenta una importante consideración con respecto al resultado significativo de la prueba CCLM para la relación entre la presencia de CD84 y el estadio de desarrollo embrionario en día 5. Los valores de OR son exageradamente elevados (Tabla 37), concretamente en el caso de la evaluación de la presencia de CD84 como porcentaje de espermatozoides positivos se obtiene una $OR=83$. Estos valores son un artefacto debido a la diferencia de densidad de población de puntos a lo largo del eje de los valores de la proteína, como explica la Figura 37, es decir, en algunos valores de CD84 el número de embriones es tan pequeño que 1 o 2 embriones de una determinada categoría de desarrollo representa un porcentaje muy elevado del total de embriones, mientras que en otros valores del CD84 no es así ya que la densidad de embriones es mucho mayor. Esta diferencia de densidades el modelo no lo tiene en cuenta y por lo tanto

encuentra una relación significativa entre la presencia de CD84 y el estadio de desarrollo en día 5 de desarrollo, no podemos asumir como real.

En conclusión, CD84 no parece tener aplicación como biomarcador de calidad embrionaria, de desarrollo embrionario o de viabilidad embrionaria.

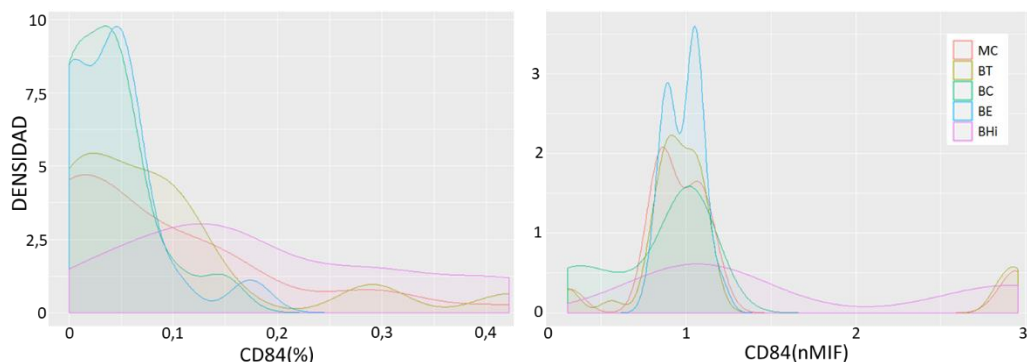


Figura 37 Representaciones gráficas de la densidad de embriones en cada categoría de desarrollo de blastocisto en día 5 cuando aumenta la presencia CD84 en los espermatozoides utilizados en tratamientos con ovocitos propios. Se muestra la presencia de CD84 media en: A. porcentaje de espermatozoides con CD84. B. mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada.

PLA2G2A

Del mismo modo que en el caso anterior, se ha evaluado la relación entre la presencia de PLA2G2A en los espermatozoides utilizados para los tratamientos de ICSI (medida tanto en porcentaje de espermatozoides con la molécula, como en cantidad relativa de molécula por espermatozoide) con los parámetros de calidad y desarrollo de los embriones que se analizan en este estudio.

A pesar de que dónde más cabría esperar una relación es en los tratamientos de FIV convencional e IA, puesto que donde parece que tiene más relación es en la fusión de membranas (Lessig et al. 2006, Riffo and Parraga 1997), sí hemos encontrado relaciones con el desarrollo de los embriones tras ICSI.

Concretamente se ha detectado una mayor probabilidad de tener más embriones viables cuando aumenta la presencia de PLA2G2A (tanto el porcentaje de espermatozoides como la cantidad por espermatozoide) únicamente en tratamientos con ovocitos propios. En el caso de los tratamientos con ovocitos donados no se ha encontrado esta relación con la probabilidad de tener embriones viables pero si con el desarrollo en día 6 encontrándose una relación significativa entre la presencia de la molécula (tanto el porcentaje de espermatozoides como la cantidad relativa por célula) y un aumento de la probabilidad de tener blastocistos más desarrollados.

Cabe señalar que los análisis de desarrollo en día 6 son realizados sobre un número de embriones mucho más pequeño que en el resto de variables, ya que lo forman los embriones evolutivos que no han sido congelados/transferidos en días anteriores y por lo tanto los resultados mucho menos robustos.

Puesto que no se encuentra mayor calidad embrionaria al aumentar la cantidad de PLA2G2A en la muestra de espermatozoides, podemos asumir que el aumento del número de embriones viables cuando aumenta la presencia de PLA2G2A en los tratamientos con ovocitos propios puede ser debido a un aumento del número de embriones fecundados (mayor tasa de fecundación), lo que le atribuiría a esta molécula algún rol en la fecundación, como ya ha demostrado algunos autores ocurre con la familia de las PLA2 (Lessig et al. 2006, Riffo and Parraga 1997).

Sin embargo, en este caso como en el anterior, estos resultados parecen no ser reales sino nuevamente un artefacto debido a la gran diferencia en el número de embriones para cada valor de PLA2G2A (Figura 38). Incluso en este caso se puede apreciar claramente que la distribución de los embriones es muy similar entre la

poblacion de embriones viables y no viables, lo que apoya el echo que de los resultados de CLMM sean un artefacto.

En resumen, a pesar de que estos resultados no pueden considerarse fiables, pueden ser el punto de partida para nuevos estudios que evalúen las posibles implicaciones de esta molécula en la fecundación de ovocitos.

UBQ

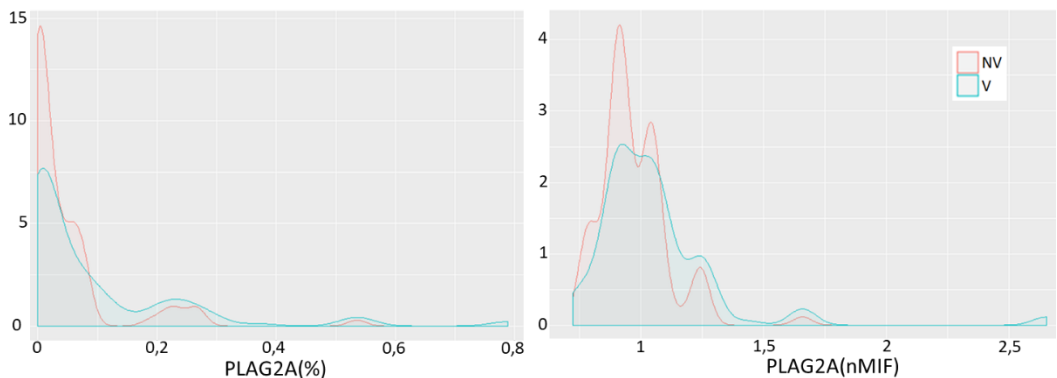


Figura 38 Representaciones gráficas de la densidad de embriones viables y no viables cuando aumenta la presencia PLA2G2A en los espermatozoides utilizados en tratamientos con ovocitos propios. Se muestra la presencia de PLA2G2A media en: A. porcentaje de espermatozoides con PLA2G2A. B. mediana de la intensidad de fluorescencia normalizada

En el caso de la UBQ como marcador de calidad embrionaria, se ha encontrado una relación positiva y estadísticamente significativa entre la presencia de esta molécula en los espermatozoides utilizados para tratamientos de ICSI con ovocitos propios y la probabilidad de tener embriones viables, así como con la calidad de los embriones en día 3 de desarrollo (aumentan los poco fragmentados). Resultados coherentes entre sí y con la posibilidad de que la ubiquitina sea un marcador de buena calidad embrionaria en tratamientos de ovocitos propios.

Por otro lado, en los tratamientos llevados a cabo con ovocitos donados, se ha encontrado una relación negativa y significativa con la calidad embrionaria en día 3

de desarrollo, aumentando la asimetría de los embriones conforme aumenta la presencia de la UBQ en los espermatozoides.

Esta diferencia de resultados entre los casos con ovocitos propios y los donados (donde se encuentra la relación contraria en cuanto a calidad en día 3), puede ser fruto de una particularidad de este estudio, ya que en las pacientes con ovocitos propios el único criterio de inclusión/exclusión diferente o añadido con respecto a los tratamientos con donación de ovocitos, es la edad. Es decir, en ningún caso se han excluido los casos de pacientes con fallos ováricos ocultos, con bajas reservas ováricas, etc. que se sabe que suponen peor calidad embrionaria y tasas más bajas de embarazo (Melado Vidales et al. 2017, Zakhari et al. 2018). Esto puede tener dos repercusiones por un lado al ser los ovocitos de donante mejores ovocitos, les afecta menos lo que aporten los espermatozoides o por otro lado estadísticamente en el caso de los tratamientos propios los resultados de este estudio son una desviación (un efecto estadístico, no real).

Además en este caso también se puede apreciar la diferencia en la cantidad de embriones analizados procedentes de muestras de espermatozoides con distintos niveles UBQ, explicadas en las moléculas anteriores, que lleva a pensar que los resultados significativos encontrados no sean reales.

Por lo tanto, son necesarios más estudios que verifiquen la relación entre la presencia de esta molécula y la calidad embrionaria en tratamientos con ovocitos propios. Y por otro lado, para aclarar qué papel puede tener esta molécula en el desarrollo temprano de los embriones que provoque una mejora en los embriones de ovocitos propios y empeore los embriones procedentes de ovocitos donados.

15.3 Relacionar las tres moléculas estudiadas en los espermatozoides con los resultados de los tratamientos de reproducción asistida

Para evaluar la calidad de un espermatozoide, debemos evaluar si dicho espermatozoide es capaz de realizar su función, fecundar un ovocito, dando lugar a un embrión capaz de implantarse en el útero materno y desarrollarse hasta un recién nacido.

Existen, por lo tanto, diferentes maneras de evaluar la capacidad de un espermatozoide, como son: la tasa de fecundación, la tasa de implantación, la tasa de gestación y la tasa de recién nacido vivo, entre otras. Debido a que el propósito último de toda TRA es el de conseguir un bebé sano, a nuestro juicio, la variable de resultado más interesante sería la tasa de recién nacido en casa. Sin embargo, debido a las complicaciones obvias que supone conseguir esa información y el tiempo de espera necesario para conocer el resultado, se han evaluado las tasas de gestación, bioquímica, clínica y evolutiva.

En este objetivo se ha buscado la asociación entre las tasas de gestación y la presencia de las tres moléculas en estudio en las muestras de espermatozoides utilizadas para los tratamientos, con la intención de identificar si CD84, PLA2G2A o UBQ podría ser usados como biomarcador de transferencia del embrión capaz de dar lugar a un embarazo o al menos, ver si su presencia en los espermatozoides influye en los resultados de las TRA.

CD84

Los resultados de la presente investigación muestran que el CD84 no está relacionado con ninguna de las variables de resultado de tratamiento analizadas (gestación bioquímica, gestación clínica y gestación evolutiva).

Sin embargo, estudios previos encontraron una asociación entre el ARN mensajero de esta proteína y el resultado de todas las TRA analizada en dicho estudio (IAH, FIV e ICSI), ya que únicamente se encontraba presente en espermatozoides que daban lugar a embarazo (Garcia-Herrero 2012). Nuestra investigación no reproduce estos resultados a nivel de proteína.

Esto podría ser debido a que el ARNm del CD84 realice su función en el ovocito directamente. Se ha detallado en la introducción que a los ARNm de los espermatozoides se les atribuyen diferentes funciones en el ovocito y el embrión temprano, como son: transcribirse a proteínas en el ovocito y realizar su función en el desarrollo embrionario temprano, modular epigenéticamente la expresión génica o proteger al genoma en el desarrollo embrionario temprano, entre otras (Jodar et al. 2013, Miller and Ostermeier 2006).

En ese caso, se explicaría el hecho de que en la presente investigación apenas se encuentre esta molécula en los espermatozoides y que no se detecte ninguna relación con los resultados de las TRA. Sin embargo, para verificar esta teoría sería necesario aumentar el tamaño muestral del estudio, así como verificar con otras técnicas de detección de proteína la presencia/ausencia del CD84 en los espermatozoides.

PLA2G2A

Como en el caso anterior, con la intención de determinar si PLA2G2A podría ser usado como marcador de calidad seminal o ver si influye en los resultados de las TRA, se ha investigado si existe relación entre la presencia de esta molécula en los espermatozoides, con las variables de resultado de TRA; en este caso, embarazo bioquímico, gestación clínica y evolutiva.

Los resultados de este análisis muestran que no existe ninguna asociación entre las variables anteriormente detalladas.

Puesto que la PLA2G2A pertenece a una familia de proteínas que se ha demostrado que en general intervienen en procesos de remodelado de membranas (García et al. 2008), incluso dentro del ámbito de la fertilidad humana, como la fusión de membranas entre ovocito y espermatozoide (Lessig et al. 2006, Riffo and Parraga 1997) y en la reacción acrosómica del espermatozoide (Gramajo-Buhler et al. 2016, Pietrobon et al. 2005, Shi et al. 2005), cabría esperar encontrar cierta asociación positiva, al menos, entre la presencia de esta molécula y el resultado de las TRA donde el espermatozoide entra por sí solo en el ovocito (inseminación artificial y fecundación in vitro). De este modo, no esperaríamos dicha asociación en los tratamientos de ICSI, donde al introducir el espermatozoide “manualmente” en el interior del ovocito se “bypasses” el reconocimiento entre gametos y la fusión de los mismos.

A pesar de que fue únicamente utilizando la técnica de FIV convencional, donde García-Herrero y colaboradores describieron una diferencia muy significativa en la presencia del transcrito de PLA2G2A entre las muestras que lograban embarazo y las que no lo hacían (García-Herrero 2012), en el presente estudio no se ha podido incluir esta técnica de reproducción asistida por encontrarse en nuestros laboratorios prácticamente en desuso. Es interesante señalar que en los estudios de García-Herrero, esta molécula se presentaría como un potencial marcador de mala calidad seminal, ya que se encuentra sobreexpresado en muestras que no dan lugar a embarazo; lo cual es contrario a los estudios que proponen a la familia de la PLA2 como necesaria para la reacción acrosómica (Gramajo-Buhler et al. 2016, Pietrobon et al. 2005, Shi et al. 2005).

UBQ

En último lugar y nuevamente con el objetivo de determinar si la presencia de esta proteína influye de alguna manera en los resultados de las TRA y si podría ser utilizada como marcador de competencia espermática, se han relacionado los porcentajes de espermatozoides que presentan UBQ en superficie y la cantidad relativa de molécula por espermatozoide con las variables de resultado de las TRA.

Tampoco en el caso de la UBQ se ha encontrado ninguna asociación lineal entre la presencia de esta molécula y la consecución de un embarazo bioquímico, clínico, ni evolutivo.

No existen muchos estudios que evalúen una posible asociación entre la presencia de UBQ y los resultados de TRA y la mayoría de ellos valoran el resultado con variables como tasa de fecundación o tasa de división embrionaria, en muy pocos estudios se valora la gestación como variable resultado.

De cualquier modo, la información disponible sobre este objetivo tampoco es concluyente ya que se encuentran resultados opuestos y metodologías muy diferentes entre estudios. Mientras algunos grupos evalúan la presencia de la UBQ en muestras sin procesar no encontrando relación entre esta y el éxito del tratamiento para las que fueron usadas (Sutovsky et al. 2001b), otros evalúan la presencia de la UBQ en muestra procesadas (capacitadas) describiendo una menor cantidad de UBQ en muestras de parejas (con infertilidad idiopática o factor femenino) que consiguen un embarazo que en parejas que no lo hacen (Ozanon et al. 2005). En la misma línea, a favor de la tesis que defiende a la UBQ como marcador de mala calidad seminal, Odhiambo y su equipo, trabajando con ganado vacuno, consiguen una mayor tasa de embarazo cuando purifican las muestras seminales, retirando de la muestra los espermatozoides con UBQ en su membrana (Odhiambo et al. 2014).

También cuando se evalúa la tasa de fecundación, los resultados son dispares. Ozanon y colaboradores encuentran una correlación negativa entre la presencia de esta molécula y el porcentaje de embriones correctamente fecundados (2 pronúcleos), únicamente en pacientes con infertilidad por factor masculino (Ozanon et al. 2005). Sin embargo, el grupo de Eskandari aprecian una asociación positiva entre la intensidad de UBQ (no así el porcentaje de espermatozoides con UBQ) y la tasa de fecundación (Eskandari-Shahraki et al. 2013).

La falta de consenso y la poca robustez de nuestro estudio, debido al bajo número de casos estudiados, no permite ser concluyente sobre la asociación de la presencia de UBQ en los espermatozoides y la tasa de gestación tras una TRA. Por lo tanto, son necesarios más estudios.

16. Objetivo 2. Evaluación de la eficiencia de la separación de espermatozoides mediante MACS, en función de UBQ y PLA2G2A

La técnica de selección celular MACS ya está siendo utilizada en múltiples estudios para separar muy diversos tipos celulares con intenciones clínicas concretas, como por ejemplo: aislamiento de células madres mesenquimales para su uso en el campo de la medicina regenerativa (Nicodemou and Danisovic 2017), células madre de cordón umbilical para casos de trasplante de médula ósea (Islami et al. 2017), células asesinas inducidas por citoquinas (CIK cells) como terapia celular contra tumores malignos (Liu et al. 2017), etc.

En el campo de la preservación de la fertilidad masculina, varios grupos han desarrollado protocolos para aislar células madre espermátogoniales en función de diferentes marcadores testiculares. Estos protocolos tienen como objetivo último utilizar dichas células aisladas para regenerar la espermatogénesis tras una lesión

testicular, hecho de especial interés en pacientes sometidos a tratamientos quimioterápicos (Gassei et al. 2009, Gassei et al. 2010, He et al. 2010, Li et al. 2014, Valli et al. 2014, Zohni et al. 2012).

Las características de sencillez, efectividad, bajo coste y recuperación celular intacta, hacen de esta técnica un aliado de los tratamientos de reproducción. Por ello ya está siendo utilizado en las clínicas de fertilidad, previamente a un TRA, separando los espermatozoides apoptóticos de los no apoptóticos, en función del marcador de apoptosis localizado en la membrana espermática, la PS (Polak de Fried and Denaday 2010, Rawe et al. 2010, Romany et al. 2014).

Del mismo modo, la técnica de MACS podría ser utilizada para enriquecer o empobrecer una muestra de espermatozoides en las moléculas que nos interesen y que se encuentren en la membrana de los mismos. De esta manera podríamos aumentar la cantidad de espermatozoides que presenten una determinada molécula en su membrana que se haya visto que es un marcador de calidad, o bien, retirar de una muestra los espermatozoides que presenten las moléculas cuya presencia se haya relacionado con mala calidad espermática o malos resultados tras un tratamiento de reproducción.

Esta interesante y potencial utilidad de la técnica MACS es la que ha llevado a nuestro grupo a intentar separar muestras de espermatozoides en función de PLA2G2A y UBQ y probar la eficiencia de dicha separación. Con el fin último de mejorar la selección de los espermatozoides para una TRA y de esta manera mejorar las tasas de éxito de estos tratamientos.

La separación de espermatozoides con PLA2G2A en su membrana utilizando MACS no ha resultado en su mayoría exitosa, consiguiendo únicamente en uno de los cuatro ensayos un enriquecimiento de la muestra en estos espermatozoides. Cabe

señalar que quizá la técnica utilizada en este estudio para la verificación de la correcta separación tras la aplicación del MACS, la RT-PCR, no sea en este caso la técnica más adecuada. Puesto que según los resultados de las investigaciones de Garcia-Herrero y colaboradores (Garcia-Herrero 2012) todas las muestras estudiadas presentaban este transcrito, sin embargo, nuestros resultados muestran que no todas las muestras presentaban la proteína, esto nos lleva a pensar que no en todos los casos el transcrito se traduce a proteína y por lo tanto la eficiencia de la separación hubiera sido más interesante evaluarla técnicas de detección de proteínas como el Western Blot. Sin embargo, no se ha tenido éxito con este tipo de técnicas, probablemente por varios motivos; entre ellos la presencia de albumina en los medios utilizados para la capacitación seminal que interfieren en la lectura de técnicas como el Western Blot. Otra posible causa es la saturación de los epítomos de la proteína con los anticuerpos para la separación por MACS que impide la unión de nuevos anticuerpos para la detección directa de la proteína. Y una teórica aproximación indirecta (a través de la detección de los anticuerpos utilizados para la separación) no sea tampoco eficaz puesto que la separación por MACS realizada en este trabajo, ya es en sí misma indirecta (dos anticuerpos).

Por lo tanto, teniendo en cuenta las débiles asociaciones encontradas entre la presencia de PLA2GA y la calidad embrionaria, la ausencia de correlación con los resultados de las TRA y la dificultad demostrada para encontrar un protocolo de separación basado en la técnica de MACS que sea 100% eficaz, no consideramos justificado continuar invirtiendo esfuerzos en poner a punto esta técnica.

En el caso de la separación en función de la UBQ, si se ha conseguido una población enriquecida en espermatozoides con esta molécula en su membrana. No obstante, no se ha conseguido que la separación sea 100% eficaz, es decir, no se ha conseguido que todos los espermatozoides con UBQ se encuentren en la fracción

positiva tras la separación. A pesar de que sabemos que esto es posible ya que se ha demostrado en numerosos estudios que esta técnica tiene una eficiencia muy elevada (Islami et al. 2017, Li et al. 2014, Tayebi et al. 2017), quizá esta técnica no sea aplicable a cualquier tipo de molécula o las afinidades de los anticuerpos no sea en todos los casos lo suficientemente fuertes, no resistiendo estas uniones al tratamiento de las muestras para esta técnica.

En 2014, Odhiambo y colaboradores, como ya hemos mencionado, presentaron un trabajo en el que conseguían una mejora en la tasa de fecundación cuando eliminaban del semen de ganado vacuno, espermatozoides ubiquitinados (Odhiambo et al. 2014). Estos resultados no parecen reproducibles en humanos, según los resultados de este estudio, pues no se ha encontrado ninguna asociación entre el porcentaje de espermatozoides con UBQ y los resultados reproductivos.

Donde sí hemos encontrado alguna diferencia significativa, como ya hemos mencionado, es en la intensidad de fluorescencia de las muestras de semen de grupos que consiguen embarazo bioquímico tras IA y grupos que no lo hacen y una relación entre dicha intensidad y los parámetros de calidad seminal (concentración y movilidad). Por lo tanto, a nuestro juicio, sería más interesante encontrar o diseñar un método de selección de los espermatozoides con mayor cantidad de UBQ en su membrana, para aplicarlo previo a los tratamientos de IA y mejorar así los resultados de estos tratamientos que tienen una gran capacidad de mejora. Si se consiguiera aumentar la eficiencia de esta técnica, se recurriría de manera menos frecuente a técnicas más invasivas como el ICSI, cuya “seguridad” para los recién nacidos de estos tratamientos está todavía en estudio, habiéndose encontrado evidencias de que el uso de esta técnica aumenta el riesgo de: partos prematuros, bebés con menor peso, enfermedades cardíacas congénitas o malformaciones

congénitas (Giorgione et al. 2018, McGovern et al. 2004, Mozafari Kermani et al. 2018).

En el presente trabajo no se ha procedido a la comprobación de la separación con la técnica de MACS de espermatozoides en función del CD84, por dos razones: en primer lugar la media del porcentaje de espermatozoides con CD84 en las muestras analizadas fue muy pequeño, de entorno al 5% y aunque se ha demostrado que esta técnica es eficaz en poblaciones tan pequeñas (Phalke and Chiplunkar 2015, Virant-Klun et al. 2013), el hecho de que en más de un tercio de las muestras analizadas no se encontrara dicha molécula, se consideró motivo suficiente para no realizar la comprobación. La segunda razón fue la comprobación que la presencia o ausencia de la proteína no se relacionaba con los resultados reproductivos.

Conclusiones

1. El candidato CD84:

- El bajo porcentaje de espermatozoides positivos para esta molécula en una muestra de espermatozoides capacitada (entorno al 5% de media), la ausencia de relación entre su presencia y los parámetros de calidad seminal y los resultados de los tratamientos estudiados, siendo la única relación encontrada, una limitada asociación directa con el estadio de desarrollo de los embriones en su día 5 (que no se traduce en un aumento del porcentaje de embriones viables de una cohorte), llevan a descartar esta molécula como candidato a ser un buen biomarcador de calidad espermática.

2. El candidato PLA2G2A:

- Se encuentra una relación inversa entre su presencia en muestras de espermatozoides capacitadas y los parámetros de calidad seminal tras capacitar la muestra para tratamientos de ICSI (menor concentración y menor movilidad), pero no con los parámetros medidos en las muestras en fresco, lo que nos lleva a proponer la hipótesis de que la presencia de esta molécula en los espermatozoides dificulta de alguna manera su capacitación.
- A pesar de que se han encontrado relaciones directas entre la presencia de PLA2G2A y la probabilidad de tener embriones viables en una cohorte embrionaria y la probabilidad de tener blastocistos de estadio más evolucionados en día 6 de desarrollo, estas asociaciones son poco robustas y no se traducen en una mejora de los resultados de las TRA.
- El protocolo de separación con la técnica de MACS aquí implementado no es suficientemente eficaz para separar las dos poblaciones espermáticas (espermatozoides con PLA2G2A vs. sin PLA2G2A). Queda pospuesto

cualquier valoración sobre ajuste del protocolo de separación hasta no verificar la posible relación entre esta molécula y la calidad seminal.

3. El candidato UBQ:

- Todas las asociaciones encontradas en el presente trabajo entre la presencia de esta molécula en espermatozoides de muestras capacitadas y los distintos parámetros utilizados para medir la calidad espermática (parámetros de calidad seminal, resultados de TRA y calidad embrionaria) describen a la UBQ como biomarcador de buena calidad espermática. A excepción de una relación inversa en el caso de la calidad embrionaria en día 3 de desarrollo en tratamientos con ovocitos donando.
- El protocolo de separación con MACS implementado en el caso de la UBQ ha sido capaz de separar dos poblaciones con niveles de la proteína diferentes, sin embargo es necesario introducir cambios en el protocolo de separación con tal de aumentar la efectividad de la técnica.

Bibliografía

Aarabi, M.; Sutovsky, P. and Oko, R. "Re: Is PAWP the 'real' sperm factor?", *Asian J.Androl.*, 2015; 17(3):446-9.

Abu-Hassan, D. and Al-Hasani, S. "The use of ICSI for all cases of in-vitro conception", *Hum.Reprod.*, 2003; 18(4):893-4.

Agarwal, A.; Durairajanayagam, D.; Halabi, J.; Peng, J. and Vazquez-Levin, M. "Proteomics, oxidative stress and male infertility", *Reprod.Biomed.Online*, 2014; 29(1):32-58.

Agarwal, A.; Mulgund, A.; Hamada, A. and Chyatte, M.R. "A unique view on male infertility around the globe", *Reprod.Biol.Endocrinol.*, 2015; 13:37.

Agarwal, A. and Prabakaran, S.A. "Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology", *Indian.J.Exp.Biol.*, 2005; 43(11):963-74.

Ainsworth, C.; Nixon, B. and Aitken, R.J. "Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa", *Hum.Reprod.*, 2005; 20(8):2261-70.

Ainsworth, C.; Nixon, B.; Jansen, R.P. and Aitken, R.J. "First recorded pregnancy and normal birth after ICSI using electrophoretically isolated spermatozoa", *Hum.Reprod.*, 2007; 22(1):197-200.

Aitken, R.J.; De Iuliis, G.N.; Finnie, J.M.; Hedges, A. and McLachlan, R.I. "Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria", *Hum.Reprod.*, 2010; 25(10):2415-26.

Allegra, A.; Marino, A.; Coffaro, F.; Lama, A.; Rizza, G.; Scaglione, P.; Sammartano, F.; Santoro, A. and Volpes, A. "Is there a uniform basal endometrial gene expression profile during the implantation window in women who became pregnant in a subsequent ICSI cycle?", *Hum.Reprod.*, 2009; 24(10):2549-57.

ALPHA Scientists In Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group Embryology "Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting", *Reprod.Biomed.Online*, 2011; 22(6):632-46.

Alvarez, J.G.; Touchstone, J.C.; Blasco, L. and Storey, B.T. "Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity", *J.Androl.*, 1987; 8(5):338-48.

Anfuso, C.D.; Olivieri, M.; Bellanca, S.; Salmeri, M.; Motta, C.; Scalia, M.; Satriano, C.; La Vignera, S.; Burrello, N.; Caporarello, N.; Lupo, G. and Calogero, A.E. "Asthenozoospermia and membrane remodeling enzymes: a new role for phospholipase A2", *Andrology*, 2015; 3(6):1173-82.

ASEBIR. *Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos*. Tercera ed, Madrid: Góbal, 2015.

Avendano, C.; Franchi, A.; Jones, E. and Oehninger, S. "Pregnancy-specific {beta}-1-glycoprotein 1 and human leukocyte antigen-E mRNA in human sperm: differential expression in fertile and infertile men and evidence of a possible functional role during early development", *Hum.Reprod.*, 2009; 24(2):270-7.

Aydin, S.; Cinar, O.; Demir, B.; Korkmaz, C.; Ozdegirmenci, O.; Dilbaz, S. and Goktolga, U. "Is pronuclear scoring a really good predictor for ICSI cycles?", *Gynecol.Endocrinol.*, 2011; 27(10):742-7.

Azimineko, E.; Mohseni Salehi, M.S.; Kalantari, V.; Shahrokh Tehraninejad, E.; Haghollahi, F.; Hossein Rashidi, B. and Zandieh, Z. "Pregnancy outcome after blastocyst stage transfer comparing to early cleavage stage embryo transfer", *Gynecol.Endocrinol.*, 2015; 31(11):880-4.

Baker, M.A.; Reeves, G.; Hetherington, L.; Muller, J.; Baur, I. and Aitken, R.J. "Identification of gene products present in Triton X-100 soluble and insoluble fractions of human spermatozoa lysates using LC-MS/MS analysis", *Proteomics Clin.Appl.*, 2007; 1(5):524-32.

Bansal, S.K.; Gupta, N.; Sankhwar, S.N. and Rajender, S. "Differential Genes Expression between Fertile and Infertile Spermatozoa Revealed by Transcriptome Analysis", *PLoS One*, 2015; 10(5):e0127007.

Barroso, G.; Taylor, S.; Morshedi, M.; Manzur, F.; Gavino, F. and Oehninger, S. "Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations", *Fertil.Steril.*, 2006; 85(1):149-54.

Barroso, G.; Valdespin, C.; Vega, E.; Kershenovich, R.; Avila, R.; Avendano, C. and Oehninger, S. "Developmental sperm contributions: fertilization and beyond", *Fertil.Steril.*, 2009; 92(3):835-48.

Bartoov, B.; Berkovitz, A. and Eltes, F. "Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection", *N.Engl.J.Med.*, 2001; 345(14):1067-8.

Beck-Fruchter, R.; Shalev, E. and Weiss, A. "Clinical benefit using sperm hyaluronic acid binding technique in ICSI cycles: a systematic review and meta-analysis", *Reprod.Biomed.Online*, 2016; 32(3):286-98.

Belloc, S.; Hazout, A.; Zini, A.; Merviel, P.; Cabry, R.; Chahine, H.; Copin, H. and Benkhalifa, M. "How to overcome male infertility after 40: Influence of paternal age on fertility", *Maturitas*, 2014; 78(1):22-9.

Bhattacharya, S.; Hamilton, M.P.; Shaaban, M.; Khalaf, Y.; Seddler, M.; Ghobara, T.; Braude, P.; Kennedy, R.; Rutherford, A.; Hartshorne, G. and Templeton, A. "Conventional in-vitro fertilisation versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomised controlled trial", *Lancet*, 2001; 357(9274):2075-9.

Boerke, A.; Dieleman, S.J. and Gadella, B.M. "A possible role for sperm RNA in early embryo development", *Theriogenology*, 2007; 68 Suppl 1:147-55.

Bonache, S.; Mata, A.; Ramos, M.D.; Bassas, L. and Larriba, S. "Sperm gene expression profile is related to pregnancy rate after insemination and is predictive of low fecundity in normozoospermic men", *Hum.Reprod.*, 2012; 27(6):1556-67.

Borini, A.; Tarozzi, N.; Bizzaro, D.; Bonu, M.A.; Fava, L.; Flamigni, C. and Coticchio, G. "Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART", *Hum.Reprod.*, 2006; 21(11):2876-81.

Bose, R.; Manku, G.; Culty, M. and Wing, S.S. "Ubiquitin-proteasome system in spermatogenesis", *Adv.Exp.Med.Biol.*, 2014; 759:181-213.

Boyle, C.A.; Khoury, M.J.; Katz, D.F.; Annett, J.L.; Kresnow, M.J.; DeStefano, F. and Schrader, S.M. "The relation of computer-based measures of sperm morphology and motility to male infertility", *Epidemiology*, 1992; 3(3):239-46.

Bradley, C.K.; McArthur, S.J.; Gee, A.J.; Weiss, K.A.; Schmidt, U. and Toogood, L. "Intervention improves assisted conception intracytoplasmic sperm injection outcomes for patients with high levels of sperm DNA fragmentation: a retrospective analysis", *Andrology*, 2016; 4(5):903-10.

Bungum, M. "Sperm DNA integrity assessment: a new tool in diagnosis and treatment of fertility", *Obstet.Gynecol.Int.*, 2012; 2012:531042.

Bungum, M.; Humaidan, P.; Axmon, A.; Spano, M.; Bungum, L.; Erenpreiss, J. and Giwercman, A. "Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome", *Hum.Reprod.*, 2007; 22(1):174-9.

Cannons, J.L.; Qi, H.; Lu, K.T.; Dutta, M.; Gomez-Rodriguez, J.; Cheng, J.; Wakeland, E.K.; Germain, R.N. and Schwartzberg, P.L. "Optimal germinal center responses require a multistage T cell:B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84", *Immunity*, 2010; 32(2):253-65.

Cannons, J.L.; Tangye, S.G. and Schwartzberg, P.L. "SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity", *Annu.Rev.Immunol.*, 2011; 29:665-705.

Carrell, D.T.; Emery, B.R. and Hammoud, S. "Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link?", *Hum.Reprod.Update*, 2007; 13(3):313-27.

Carrell, D.T. and Hammoud, S.S. "The human sperm epigenome and its potential role in embryonic development", *Mol.Hum.Reprod.*, 2010; 16(1):37-47.

Chan, L.Y.; Yim, E.K. and Choo, A.B. "Normalized median fluorescence: an alternative flow cytometry analysis method for tracking human embryonic stem cell states during differentiation", *Tissue Eng.Part C.Methods*, 2013; 19(2):156-65.

Chan, P.J.; Jacobson, J.D.; Corselli, J.U. and Patton, W.C. "A simple zeta method for sperm selection based on membrane charge", *Fertil.Steril.*, 2006; 85(2):481-6.

Ciray, H.N.; Coban, O.; Bayram, A.; Kizilkanat, A. and Bahceci, M. "Preliminary study of embryo development following assessment of male and female gametes", *Reprod.Biomed.Online*, 2008; 16(6):875-80.

Cobo, A.; de los Santos, M J; Castello, D.; Gamiz, P.; Campos, P. and Remohi, J. "Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a

cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles", *Fertil.Steril.*, 2012; 98(5):1138-46.

Coello, A.; Meseguer, M.; Galan, A.; Alegre, L.; Remohi, J. and Cobo, A. "Analysis of the morphological dynamics of blastocysts after vitrification/warming: defining new predictive variables of implantation", *Fertil.Steril.*, 2017; 108(4):659-66.

Collins, J.A.; Barnhart, K.T. and Schlegel, P.N. "Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization?", *Fertil.Steril.*, 2008; 89(4):823-31.

Cox, L.J.; Larman, M.G.; Saunders, C.M.; Hashimoto, K.; Swann, K. and Lai, F.A. "Sperm phospholipase C ζ from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca²⁺ oscillations, activation and development of mouse oocytes", *Reproduction*, 2002; 124(5):611-23.

Dadoune, J.P.; Pawlak, A.; Alfonsi, M.F. and Siffroi, J.P. "Identification of transcripts by macroarrays, RT-PCR and in situ hybridization in human ejaculate spermatozoa", *Mol.Hum.Reprod.*, 2005; 11(2):133-40.

Dar, S.; Lazer, T.; Shah, P.S. and Librach, C.L. "Neonatal outcomes among singleton births after blastocyst versus cleavage stage embryo transfer: a systematic review and meta-analysis", *Hum.Reprod.Update*, 2014; 20(3):439-48.

de Kretser, D.M.; O'Bryan, M.K.; Lynch, M.; Reilly, A.; Kennedy, C.; Cram, D. and McLachlan, R.I. "Chapter 16. The Genetics of Male Infertility. From Bench to Clinic". En: D.T. Carrell, ed. *The genetics of male infertility*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.; 2007. p. 251-266.

de Mateo, S.; Martinez-Heredia, J.; Estanyol, J.M.; Dominguez-Fandos, D.; Vidal-Taboada, J.M.; Ballesca, J.L. and Oliva, R. "Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa", *Proteomics*, 2007; 7(23):4264-77.

De Vos, A.; Van de Velde, H.; Bocken, G.; Eysenbosch, G.; Franceus, N.; Meersdom, G.; Tistaert, S.; Vankelecom, A.; Tournaye, H. and Verheyen, G. "Does intracytoplasmic morphologically selected sperm injection improve embryo development? A randomized sibling-oocyte study", *Hum.Reprod.*, 2013; 28(3):617-26.

Dirican, E.K.; Ozgun, O.D.; Akarsu, S.; Akin, K.O.; Ercan, O.; Ugurlu, M.; Camsari, C.; Kanyilmaz, O.; Kaya, A. and Unsal, A. "Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction", *J.Assist.Reprod.Genet.*, 2008; 25(8):375-81.

El Khattabi, L.; Dupont, C.; Sermondade, N.; Hugues, J.N.; Poncelet, C.; Porcher, R.; Cedrin-Durnerin, I.; Levy, R. and Sifer, C. "Is intracytoplasmic morphologically selected sperm injection effective in patients with infertility related to teratozoospermia or repeated implantation failure?", *Fertil.Steril.*, 2013; 100(1):62-8.

Eliasson, R. "Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects", *Asian J.Androl.*, 2010; 12(1):26-32.

Ellis, D.I.; Cowcher, D.P.; Ashton, L.; O'Hagan, S. and Goodacre, R. "Illuminating disease and enlightening biomedicine: Raman spectroscopy as a diagnostic tool", *Analyst*, 2013; 138(14):3871-84.

Elmore, S. "Apoptosis: a review of programmed cell death", *Toxicol.Pathol.*, 2007; 35(4):495-516.

Erenpreiss, J.; Spano, M.; Erenpreisa, J.; Bungum, M. and Giwercman, A. "Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects", *Asian J.Androl.*, 2006; 8(1):11-29.

Esbert, M.; Pacheco, A.; Vidal, F.; Florensa, M.; Riqueros, M.; Ballesteros, A.; Garrido, N. and Calderon, G. "Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes", *Reprod.Biomed.Online*, 2011; 23(6):704-10.

Escoffier, J.; Yassine, S.; Lee, H.C.; Martinez, G.; Delaroche, J.; Coutton, C.; Karaouzene, T.; Zouari, R.; Metzler-Guillemain, C.; Pernet-Gallay, K.; Hennebicq, S.; Ray, P.F.; Fissore, R. and Arnoult, C. "Subcellular localization of phospholipase Czeta in human sperm and its absence in DPY19L2-deficient sperm are consistent with its role in oocyte activation", *Mol.Hum.Reprod.*, 2015; 21(2):157-68.

Escriba, M.J.; Bellver, J.; Bosch, E.; Sanchez, M.; Pellicer, A. and Remohi, J. "Delaying the initiation of progesterone supplementation until the day of fertilization does not compromise cycle outcome in patients receiving donated oocytes: a randomized study", *Fertil.Steril.*, 2006; 86(1):92-7.

ESHRE. 2017. ART fact sheet 2016
. Available: <https://www.eshre.eu/Press-Room/Resources.aspx> [2017, Oct 30,].

Eskandari-Shahraki, M.; Tavalaei, M.; Deemeh, M.R.; Jelodar, G.A. and Nasr-Esfahani, M.H. "Proper ubiquitination effect on the fertilisation outcome post-ICSI", *Andrologia*, 2013; 45(3):204-10.

Fernandez, J.L.; Vazquez-Gundin, F.; Delgado, A.; Goyanes, V.J.; Ramiro-Diaz, J.; de la Torre, J. and Gosálvez, J. "DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features", *Mutat.Res.*, 2000; 453(1):77-82.

Fissore, R.A.; Reis, M.M. and Palermo, G.D. "Isolation of the Ca²⁺ releasing component(s) of mammalian sperm extracts: the search continues", *Mol.Hum.Reprod.*, 1999; 5(3):189-92.

Fleming, S.D.; Ilad, R.S.; Griffin, A.M.; Wu, Y.; Ong, K.J.; Smith, H.C. and Aitken, R.J. "Prospective controlled trial of an electrophoretic method of sperm preparation for assisted reproduction: comparison with density gradient centrifugation", *Hum.Reprod.*, 2008; 23(12):2646-51.

Focarelli, R.; Rosati, F. and Terrana, B. "Sialoglycoconjugates release during in vitro capacitation of human spermatozoa", *J.Androl.*, 1990; 11(2):97-104.

Fujimoto, S.; Yoshida, N.; Fukui, T.; Amanai, M.; Isobe, T.; Itagaki, C.; Izumi, T. and Perry, A.C. "Mammalian phospholipase C ζ induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix", *Dev.Biol.*, 2004; 274(2):370-83.

Gandini, L.; Lombardo, F.; Paoli, D.; Caponecchia, L.; Familiari, G.; Verlengia, C.; Dondero, F. and Lenzi, A. "Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa", *Hum.Reprod.*, 2000; 15(4):830-9.

García, G.A.; Gaitán, A.A.; García Cardona, A.; Clavijo Grimaldi, D., Mejía, O.R.; Cobos, C. and Casadiego, C.A. "Aspectos biomédicos de las fosfolipasas A2 en la especie humana.", *Med UNAB.*, 2008; 11(1):14-27.

García, G.A. and García Cardona, A. "Fosfolipasas A2: Grandes familias y mecanismos de acción", *Repert.med.cir.*, 2009; 18(4):199-209.

Garcia-Herrero, S.; Garrido, N.; Martinez-Conejero, J.A.; Remohi, J.; Pellicer, A. and Meseguer, M. "Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI", *Reprod.Biomed.Online*, 2011; 22(1):25-36.

Garcia-Herrero, S.; Garrido, N.; Martinez-Conejero, J.A.; Remohi, J.; Pellicer, A. and Meseguer, M. "Ontological evaluation of transcriptional differences between sperm of infertile males and fertile donors using microarray analysis", *J.Assist.Reprod.Genet.*, 2010a; 27(2-3):111-20.

Garcia-Herrero, S.; Meseguer, M.; Martinez-Conejero, J.A.; Remohi, J.; Pellicer, A. and Garrido, N. "The transcriptome of spermatozoa used in homologous intrauterine insemination varies considerably between samples that achieve pregnancy and those that do not", *Fertil.Steril.*, 2010b; 94(4):1360-73.

Garcia-Herrero, S. *Transcriptómica de la infertilidad masculina*, Universidad de Valencia. Facultad de CC Biológicas. 2012, Valencia (España).

Garcia-Vazquez, F.A.; Gadea, J.; Matas, C. and Holt, W.V. "Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals", *Asian J.Androl.*, 2016; 18(6):844-50.

Garrido, N.; Martinez-Conejero, J.A.; Jauregui, J.; Horcajadas, J.A.; Simon, C.; Remohi, J. and Meseguer, M. "Microarray analysis in sperm from fertile and infertile men without basic sperm analysis abnormalities reveals a significantly different transcriptome", *Fertil.Steril.*, 2009; 91(4 Suppl):1307-10.

Garrido, N.; Melo, M.A.B.; Simón, C.; Remohí, J.; Pellicer, A. and Meseguer, M. "Ovarian stimulation length, number of follicles higher than 17 mm and estradiol on the day of human chorionic gonadotropin administration are risk factors for multiple pregnancy in intrauterine insemination", *Reproductive Medicine and Biology*, 2007; 6(1):19-26.

Garrido, N.; Meseguer, M.; Simon, C.; Pellicer, A. and Remohi, J. "Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility", *Asian J.Androl.*, 2004; 6(1):59-65.

Garrido, N.; Remohi, J.; Martinez-Conejero, J.A.; Garcia-Herrero, S.; Pellicer, A. and Meseguer, M. "Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success", *Reprod.Biomed.Online*, 2008; 17(6):855-65.

Gartner, L.P. and Hiatt, J.L. "Capítulo 21. Sistema reproductor masculino". En: *Texto Atlas de Histología*. Segunda ed. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana de Mexico; 2002. p. 463-483.

Gassei, K.; Ehmcke, J.; Dhir, R. and Schlatt, S. "Magnetic activated cell sorting allows isolation of spermatogonia from adult primate testes and reveals distinct GFRa1-positive subpopulations in men", *J.Med.Primatol.*, 2010; 39(2):83-91.

Gassei, K.; Ehmcke, J. and Schlatt, S. "Efficient enrichment of undifferentiated GFR alpha 1+ spermatogonia from immature rat testis by magnetic activated cell sorting", *Cell Tissue Res.*, 2009; 337(1):177-83.

Gatimel, N.; Parinaud, J. and Leandri, R.D. "Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) does not improve outcome in patients with two successive IVF-ICSI failures", *J.Assist.Reprod.Genet.*, 2016; 33(3):349-55.

Gianaroli, L.; Magli, M.C.; Collodel, G.; Moretti, E.; Ferraretti, A.P. and Baccetti, B. "Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection", *Fertil.Steril.*, 2008; 90(1):104-12.

Gianaroli, L.; Magli, M.C.; Ferraretti, A.P.; Crippa, A.; Lappi, M.; Capitani, S. and Baccetti, B. "Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection", *Fertil.Steril.*, 2010; 93(3):807-13.

Gil, M.; Sar-Shalom, V.; Melendez Sivira, Y.; Carreras, R. and Checa, M.A. "Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis", *J.Assist.Reprod.Genet.*, 2013; 30(4):479-85.

Ginstrom Erntstad, E.; Bergh, C.; Khatibi, A.; Kallen, K.B.; Westlander, G.; Nilsson, S. and Wennerholm, U.B. "Neonatal and maternal outcome after blastocyst transfer: a population-based registry study", *Am.J.Obstet.Gynecol.*, 2016; 214(3):378.

Giorgione, V.; Parazzini, F.; Fesslova, V.; Cipriani, S.; Candiani, M.; Inversetti, A.; Sigismondi, C.; Tiberio, F. and Cavoletto, P. "Congenital heart defects in IVF/ICSI pregnancy: systematic review and meta-analysis", *Ultrasound Obstet.Gynecol.*, 2018; 51(1):33-42.

Giuliani, V.; Pandolfi, C.; Santucci, R.; Pelliccione, F.; Macerola, B.; Focarelli, R.; Rosati, F.; Della Giovampaola, C.; Francavilla, F. and Francavilla, S. "Expression of gp20, a human sperm antigen of epididymal origin, is reduced in spermatozoa from subfertile men", *Mol.Reprod.Dev.*, 2004; 69(2):235-40.

Glickman, M.H. and Ciechanover, A. "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction", *Physiol.Rev.*, 2002; 82(2):373-428.

Glujovsky, D.; Farquhar, C.; Quinteiro Retamar, A.M.; Alvarez Sedo, C.R. and Blake, D. "Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology", *Cochrane Database Syst.Rev.*, 2016; 6 (Art.nºCD002118).

Gonzalez-Marin, C.; Gosalvez, J. and Roy, R. "Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells", *Int.J.Mol.Sci.*, 2012; 13(11):14026-52.

Goodrich, R.; Johnson, G. and Krawetz, S.A. "The preparation of human spermatozoal RNA for clinical analysis", *Arch.Androl.*, 2007; 53(3):161-7.

Gramajo-Buhler, M.C.; Zelarayan, L. and Sanchez-Toranzo, G. "Involvement of Protein cAMP-dependent Kinase, Phospholipase A2 and Phospholipase C in Sperm Acrosome Reaction of Chinchilla lanigera", *Reprod.Domest.Anim.*, 2016; 51(1):150-7.

Grunewald, S.; Miska, W.; Miska, G.; Rasch, M.; Reinhardt, M.; Glander, H.J. and Paasch, U. "Molecular glass wool filtration as a new tool for sperm preparation", *Hum.Reprod.*, 2007; 22(5):1405-12.

Grunewald, S.; Paasch, U. and Glander, H.J. "Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting", *Cell.Tissue Bank.*, 2001; 2(3):127-33.

Grunewald, S.; Paasch, U.; Glander, H.J. and Anderegg, U. "Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA", *Andrologia*, 2005; 37(2-3):69-71.

Grunewald, S.; Reinhardt, M.; Blumenauer, V.; Said, T.M.; Agarwal, A.; Abu Hmeidan, F.; Glander, H.J. and Paasch, U. "Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility", *Fertil.Steril.*, 2009; 92(2):572-7.

Grunewald, S.; Said, T.M.; Paasch, U.; Glander, H.J. and Agarwal, A. "Relationship between sperm apoptosis signalling and oocyte penetration capacity", *Int.J.Androl.*, 2008; 31(3):325-30.

Grupo de Interés de Embriología, ASEBIR. 2013. *Estado actual GI Embriología. Noviembre 2013*. Available: <http://asebir.com/grupos-de-interes/grupo-de-interes-de-embriologia/> [2017, 09/18].

Hamatani, T. "Human spermatozoal RNAs", *Fertil.Steril.*, 2012; 97(2):275-81.

Hammoud, S.S.; Nix, D.A.; Zhang, H.; Purwar, J.; Carrell, D.T. and Cairns, B.R. "Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development", *Nature*, 2009; 460(7254):473-8.

Harada, Y.; Matsumoto, T.; Hirahara, S.; Nakashima, A.; Ueno, S.; Oda, S.; Miyazaki, S. and Iwao, Y. "Characterization of a sperm factor for egg activation at fertilization of the newt *Cynops pyrrhogaster*", *Dev.Biol.*, 2007; 306(2):797-808.

He, Z.; Kokkinaki, M.; Jiang, J.; Dobrinski, I. and Dym, M. "Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia", *Biol.Reprod.*, 2010; 82(2):363-72.

Hewitson, L.; Simerly, C.R. and Schatten, G. "Fate of sperm components during assisted reproduction: implications for infertility", *Hum.Fertil.(Camb)*, 2002; 5(3):110-6.

Hodes-Wertz, B.; Mullin, C.M.; Adler, A.; Noyes, N.; Grifo, J.A. and Berkeley, A.S. "Is intracytoplasmic sperm injection overused?", *J.Urol.*, 2012; 187(2):602-6.

Hodjat, M.; Akhondi, M.A.; Al-Hasani, S.; Mobaraki, M. and Sadeghi, M.R. "Increased sperm ubiquitination correlates with abnormal chromatin integrity", *Reprod.Biomed.Online*, 2008; 17(3):324-30.

Hou, C.C. and Yang, W.X. "New insights to the ubiquitin-proteasome pathway (UPP) mechanism during spermatogenesis", *Mol.Biol.Rep.*, 2013; 40(4):3213-30.

Huser, T.; Orme, C.A.; Hollars, C.W.; Corzett, M.H. and Balhorn, R. "Raman spectroscopy of DNA packaging in individual human sperm cells distinguishes normal from abnormal cells", *J.Biophotonics*, 2009; 2(5):322-32.

Huszar, G.; Jakab, A.; Sakkas, D.; Ozenci, C.C.; Cayli, S.; Delpiano, E. and Ozkavukcu, S. "Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects", *Reprod.Biomed.Online*, 2007; 14(5):650-63.

Ishijima, S.A.; Okuno, M. and Mohri, H. "Zeta potential of human X- and Y-bearing sperm", *Int.J.Androl.*, 1991; 14(5):340-7.

Islami, M.; Mortazavi, Y.; Soleimani, M. and Nadri, S. "In vitro expansion of CD 133+ cells derived from umbilical cord blood in poly-L-lactic acid (PLLA) scaffold coated with fibronectin and collagen", *Artif.Cells Nanomed Biotechnol.*, 2017; :1-9.

Jodar, M.; Kalko, S.; Castillo, J.; Ballesca, J.L. and Oliva, R. "Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients", *Hum.Reprod.*, 2012; 27(5):1431-8.

Jodar, M.; Selvaraju, S.; Sandler, E.; Diamond, M.P.; Krawetz, S.A. and Reproductive Medicine Network "The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs", *Hum.Reprod.Update*, 2013; 19(6):604-24.

Johnston, D.S.; Wooters, J.; Kopf, G.S.; Qiu, Y. and Roberts, K.P. "Analysis of the human sperm proteome", *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 2005; 1061:190-202.

Kaeoket, K.; Sang-urai, P.; Thamniyom, A.; Chanapiwat, P. and Techakumphu, M. "Effect of docosahexaenoic acid on quality of cryopreserved boar semen in different breeds", *Reprod.Domest.Anim.*, 2010; 45(3):458-63.

Kai, Y.; Iwata, K.; Iba, Y. and Mio, Y. "Diagnosis of abnormal human fertilization status based on pronuclear origin and/or centrosome number", *J.Assist.Reprod.Genet.*, 2015; 32(11):1589-95.

Kallajoki, M.; Alanen, K.A.; Nevalainen, M. and Nevalainen, T.J. "Group II phospholipase A2 in human male reproductive organs and genital tumors", *Prostate*, 1998; 35(4):263-72.

Kawano, N.; Yoshida, K.; Miyado, K. and Yoshida, M. "Lipid rafts: keys to sperm maturation, fertilization, and early embryogenesis", *J.Lipids*, 2011; 2011:264706.

Kheirollahi-Kouhestani, M.; Razavi, S.; Tavalaei, M.; Deemeh, M.R.; Mardani, M.; Moshtaghian, J. and Nasr-Esfahani, M.H. "Selection of sperm based on combined density gradient and Zeta method may improve ICSI outcome", *Hum.Reprod.*, 2009; 24(10):2409-16.

Knez, K.; Tomazevic, T.; Zorn, B.; Vrtacnik-Bokal, E. and Virant-Klun, I. "Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection improves development and quality of preimplantation embryos in teratozoospermia patients", *Reprod.Biomed.Online*, 2012; 25(2):168-79.

Knopman, J.; Krey, L.C.; Lee, J.; Fino, M.E.; Novetsky, A.P. and Noyes, N. "Monozygotic twinning: an eight-year experience at a large IVF center", *Fertil.Steril.*, 2010; 94(2):502-10.

Kocbek, V.; Bersinger, N.A.; Brglez, V.; Mueller, M.D.; Petan, T. and Rizner, T.L. "Phospholipase A2 group IIA is elevated in endometriomas but not in peritoneal fluid and serum of ovarian endometriosis patients", *Gynecol.Endocrinol.*, 2015; 31(3):214-8.

Kodama, H.; Yamaguchi, R.; Fukuda, J.; Kasai, H. and Tanaka, T. "Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients", *Fertil.Steril.*, 1997; 68(3):519-24.

Kouchi, Z.; Fukami, K.; Shikano, T.; Oda, S.; Nakamura, Y.; Takenawa, T. and Miyazaki, S. "Recombinant phospholipase C ζ has high Ca²⁺ sensitivity and induces Ca²⁺ oscillations in mouse eggs", *J.Biol.Chem.*, 2004; 279(11):10408-12.

Kovac, J.R.; Pastuszak, A.W. and Lamb, D.J. "The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility", *Fertil.Steril.*, 2013; 99(4):998-1007.

Kovac, J.R.; Smith, R.P.; Cajipe, M.; Lamb, D.J. and Lipshultz, L.I. "Men with a complete absence of normal sperm morphology exhibit high rates of success without assisted reproduction", *Asian J.Androl.*, 2017; 19(1):39-42.

Krawetz, S.A.; Kruger, A.; Lalancette, C.; Tagett, R.; Anton, E.; Draghici, S. and Diamond, M.P. "A survey of small RNAs in human sperm", *Hum.Reprod.*, 2011; 26(12):3401-12.

Kumar, M.; Kumar, K.; Jain, S.; Hassan, T. and Dada, R. "Novel insights into the genetic and epigenetic paternal contribution to the human embryo", *Clinics (Sao.Paulo)*, 2013; 68 Suppl 1:5-14.

Kupka, M.S.; Ferraretti, A.P.; de Mouzon, J.; Erb, K.; D'Hooghe, T.; Castilla, J.A.; Calhaz-Jorge, C.; De Geyter, C.; Goossens, V. and European IVF-Monitoring Consortium, for the European Society of Human Reproduction and Embryology "Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHREdagger", *Hum.Reprod.*, 2014; 29(10):2099-113.

Leandri, R.D.; Gachet, A.; Pfeffer, J.; Celebi, C.; Rives, N.; Carre-Pigeon, F.; Kulski, O.; Mitchell, V. and Parinaud, J. "Is intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) beneficial in the first ART cycle? a multicentric randomized controlled trial", *Andrology*, 2013; 1(5):692-7.

Lee, T.H.; Liu, C.H.; Shih, Y.T.; Tsao, H.M.; Huang, C.C.; Chen, H.H. and Lee, M.S. "Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility", *Hum.Reprod.*, 2010; 25(4):839-46.

Lefievre, L.; Bedu-Addo, K.; Conner, S.J.; Machado-Oliveira, G.S.; Chen, Y.; Kirkman-Brown, J.C.; Afnan, M.A.; Publicover, S.J.; Ford, W.C. and Barratt, C.L. "Counting sperm does not add up any more: time for a new equation?", *Reproduction*, 2007; 133(4):675-84.

Lessig, J.; Glander, H.J.; Schiller, J.; Petkovic, M.; Paasch, U. and Arnhold, J. "Destabilization of the acrosome results in release of phospholipase A2 from human spermatozoa and subsequent formation of lysophospholipids", *Andrologia*, 2006; 38(2):69-75.

Lewis, S.E. "Is sperm evaluation useful in predicting human fertility?", *Reproduction*, 2007; 134(1):31-40.

Ley14/2006. *Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida. Boletín Oficial del Estado.Núm:126.* Available: <http://www.boe.es/boe/dias/2006/05/27/pdfs/A19947-19956.pdf> [2017, Nov 04,].

Li, N.; Pan, S.; Zhu, H.; Mu, H.; Liu, W. and Hua, J. "BMP4 promotes SSEA-1(+) hUC-MSC differentiation into male germ-like cells in vitro", *Cell Prolif.*, 2014; 47(4):299-309.

Linschooten, J.O.; Van Schooten, F.J.; Baumgartner, A.; Cemeli, E.; Van Delft, J.; Anderson, D. and Godschalk, R.W. "Use of spermatozoal mRNA profiles to study

gene-environment interactions in human germ cells", *Mutat.Res.*, 2009; 667(1-2):70-6.

Liu, J.; Wang, L.; Wang, Y.; Zhang, W. and Cao, Y. "Phenotypic characterization and anticancer capacity of CD8+ cytokine-induced killer cells after antigen-induced expansion", *PLoS One*, 2017; 12(4):e0175704.

Liu, W.M.; Pang, R.T.; Chiu, P.C.; Wong, B.P.; Lao, K.; Lee, K.F. and Yeung, W.S. "Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 2012; 109(2):490-4.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method", *Methods*, 2001; 25(4):402-8.

Machtinger, R. and Racowsky, C. "Morphological systems of human embryo assessment and clinical evidence", *Reprod.Biomed.Online*, 2013; 26(3):210-21.

Maheshwari, A.; Hamilton, M. and Bhattacharya, S. "Should we be promoting embryo transfer at blastocyst stage?", *Reprod.Biomed.Online*, 2016; 32(2):142-6.

Majumdar, G. and Majumdar, A. "A prospective randomized study to evaluate the effect of hyaluronic acid sperm selection on the intracytoplasmic sperm injection outcome of patients with unexplained infertility having normal semen parameters", *J.Assist.Reprod.Genet.*, 2013; 30(11):1471-5.

Makker, K.; Agarwal, A. and Sharma, R.K. "Magnetic activated cell sorting (MACS): utility in assisted reproduction", *Indian.J.Exp.Biol.*, 2008; 46(7):491-7.

Maldjian, A.; Pizzi, F.; Gliozzi, T.; Cerolini, S.; Penny, P. and Noble, R. "Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen", *Theriogenology*, 2005; 63(2):411-21.

Mallidis, C.; Sanchez, V.; Wistuba, J.; Wuebbeling, F.; Burger, M.; Fallnich, C. and Schlatt, S. "Raman microspectroscopy: shining a new light on reproductive medicine", *Hum.Reprod.Update*, 2014; 20(3):403-14.

Mallidis, C.; Wistuba, J.; Bleisteiner, B.; Damm, O.S.; Gross, P.; Wubbeling, F.; Fallnich, C.; Burger, M. and Schlatt, S. "In situ visualization of damaged DNA in human sperm by Raman microspectroscopy", *Hum.Reprod.*, 2011; 26(7):1641-9.

Martinez-Heredia, J.; de Mateo, S.; Vidal-Taboada, J.M.; Ballesca, J.L. and Oliva, R. "Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples", *Hum.Reprod.*, 2008; 23(4):783-91.

Martins, W.P.; Nastri, C.O.; Rienzi, L.; van der Poel, S Z; Gracia, C. and Racowsky, C. "Blastocyst vs cleavage-stage embryo transfer: systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes", *Ultrasound Obstet.Gynecol.*, 2017; 49(5):583-91.

Mascarenhas, M.N.; Flaxman, S.R.; Boerma, T.; Vanderpoel, S. and Stevens, G.A. "National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys", *PLoS Med.*, 2012; 9(12):e1001356.

Matorras, R.; Coroleu, B.; Romeu, A. and Pérez, F. *LIBRO BLANCO SOCIOSANITARIO. "La Infertilidad en España: Situación Actual y Perspectivas"*. Madrid: Imago Concept & Image Development, S.L.; 2011.

Matorras, R. and Hernández, J. *Estudio y tratamiento de la pareja estéril: Recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad, con la colaboración de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción, de la Asociación Española de Andrología y de la Sociedad Española de Contracepción*. Madrid: Adalia; 2007.

McDowell, S.; Kroon, B.; Ford, E.; Hook, Y.; Glujovsky, D. and Yazdani, A. "Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction", *Cochrane Database Syst.Rev.*, 2014; 10 (Art.nºCD010461).

McGovern, P.G.; Llorens, A.J.; Skurnick, J.H.; Weiss, G. and Goldsmith, L.T. "Increased risk of preterm birth in singleton pregnancies resulting from in vitro fertilization-embryo transfer or gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis", *Fertil.Steril.*, 2004; 82(6):1514-20.

Meister, K.; Schmidt, D.A.; Brundermann, E. and Havenith, M. "Confocal Raman microspectroscopy as an analytical tool to assess the mitochondrial status in human spermatozoa", *Analyst*, 2010; 135(6):1370-4.

Melado Vidales, L.; Fernandez-Nistal, A.; Martinez Fernandez, V.; Verdu Merino, V.; Bruna Catalan, I. and Bajo Arenas, J.M. "Anti-Mullerian hormone levels to predict oocyte maturity and embryo quality during controlled ovarian hyperstimulation", *Minerva Ginecol.*, 2017; 69(3):225-32.

Meseguer, M.; Garrido, N.; Martinez-Conejero, J.A.; Simon, C.; Pellicer, A. and Remohi, J. "Relationship between standard semen parameters, calcium, cholesterol contents, and mitochondrial activity in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile males", *J.Assist.Reprod.Genet.*, 2004; 21(12):445-51.

Meseguer, M.; Santiso, R.; Garrido, N.; Garcia-Herrero, S.; Remohi, J. and Fernandez, J.L. "Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality", *Fertil.Steril.*, 2011; 95(1):124-8.

Metzler-Guillemain, C.; Victorero, G.; Lepoivre, C.; Bergon, A.; Yammine, M.; Perrin, J.; Sari-Minodier, I.; Boulanger, N.; Rihet, P. and Nguyen, C. "Sperm mRNAs and microRNAs as candidate markers for the impact of toxicants on human spermatogenesis: an application to tobacco smoking", *Syst.Biol.Reprod.Med.*, 2015; 61(3):139-49.

Milki, A.A.; Jun, S.H.; Hinckley, M.D.; Behr, B.; Giudice, L.C. and Westphal, L.M. "Incidence of monozygotic twinning with blastocyst transfer compared to cleavage-stage transfer", *Fertil.Steril.*, 2003; 79(3):503-6.

Miller, D. and Ostermeier, G.C. "Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa", *Hum.Reprod.Update*, 2006; 12(6):757-67.

Mokanszki, A.; Tothne, E.V.; Bodnar, B.; Tandor, Z.; Molnar, Z.; Jakab, A.; Ujfalusi, A. and Olah, E. "Is sperm hyaluronic acid binding ability predictive for clinical success of intracytoplasmic sperm injection: PICSi vs. ICSI?", *Syst.Biol.Reprod.Med.*, 2014; 60(6):348-54.

Montjean, D.; De La Grange, P.; Gentien, D.; Rapinat, A.; Belloc, S.; Cohen-Bacrie, P.; Menezo, Y. and Benkhalifa, M. "Sperm transcriptome profiling in oligozoospermia", *J.Assist.Reprod.Genet.*, 2012; 29(1):3-10.

Mozafari Kermani, R.; Farhangniya, M.; Shahzadeh Fazeli, S.A.; Bagheri, P.; Ashrafi, M. and Vosough Taqi Dizaj, A. "Congenital Malformations in Singleton Infants

Conceived by Assisted Reproductive Technologies and Singleton Infants by Natural Conception in Tehran, Iran", *Int.J.Fertil.Steril.*, 2018; 11(4):304-8.

Munoz, M.; Cruz, M.; Humaidan, P.; Garrido, N.; Perez-Cano, I. and Meseguer, M. "The type of GnRH analogue used during controlled ovarian stimulation influences early embryo developmental kinetics: a time-lapse study", *Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.*, 2013; 168(2):167-72.

Murakami, M.; Sato, H.; Taketomi, Y. and Yamamoto, K. "Integrated lipidomics in the secreted phospholipase A(2) biology", *Int.J.Mol.Sci.*, 2011; 12(3):1474-95.

Muratori, M.; Marchiani, S.; Criscuoli, L.; Fuzzi, B.; Tamburino, L.; Dabizzi, S.; Pucci, C.; Evangelisti, P.; Forti, G.; Noci, I. and Baldi, E. "Biological meaning of ubiquitination and DNA fragmentation in human spermatozoa", *Soc.Reprod.Fertil.Suppl.*, 2007; 63:153-8.

Muratori, M.; Marchiani, S.; Forti, G. and Baldi, E. "Sperm ubiquitination positively correlates to normal morphology in human semen", *Hum.Reprod.*, 2005; 20(4):1035-43.

Muratori, M.; Porazzi, I.; Luconi, M.; Marchiani, S.; Forti, G. and Baldi, E. "AnnexinV binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation", *J.Androl.*, 2004; 25(5):797-810.

Muratori, M.; Tamburrino, L.; Marchiani, S.; Cambi, M.; Olivito, B.; Azzari, C.; Forti, G. and Baldi, E. "Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress", *Mol.Med.*, 2015; 21:109-22.

Nallella, K.P.; Sharma, R.K.; Aziz, N. and Agarwal, A. "Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility", *Fertil.Steril.*, 2006; 85(3):629-34.

Nguyen, M.T.; Delaney, D.P. and Kolon, T.F. "Gene expression alterations in cryptorchid males using spermatozoal microarray analysis", *Fertil.Steril.*, 2009; 92(1):182-7.

Nichols, K.E.; Ma, C.S.; Cannons, J.L.; Schwartzberg, P.L. and Tangye, S.G. "Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease", *Immunol.Rev.*, 2005; 203:180-99.

Nicodemou, A. and Danisovic, L. "Mesenchymal stromal/stem cell separation methods: concise review", *Cell.Tissue Bank.*, 2017; 18(4):443-60.

Nicoli, A.; Capodanno, F.; Rondini, I.; Valli, B.; Villani, M.T.; Morini, D.; De Pascalis, L.; Palomba, S. and La Sala, G.B. "Pronuclear morphology evaluation in in vitro fertilization (IVF) / intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles: a retrospective clinical review", *J.Ovarian Res.*, 2013; 6(1):1-6.

Nieschlag, E. "Chapter 1. Scope and Goals of Andrology". En: E. Nieschlag, H.M. Behre and S. Nieschlag, eds. *Andrology. Male Reproductive Health and Dysfunction*. Third ed. Germany: Springer; 2010. p. 1-10.

Odhiambo, J.F.; DeJarnette, J.M.; Geary, T.W.; Kennedy, C.E.; Suarez, S.S.; Sutovsky, M. and Sutovsky, P. "Increased conception rates in beef cattle inseminated with nanopurified bull semen", *Biol.Reprod.*, 2014; 91(4):97.

O'Donnell, L. "Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed", *Spermatogenesis*, 2015; 4(2):e979623.

Oehninger, S. and Gosden, R.G. "Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? No, not in light of the scientific data", *Hum.Reprod.*, 2002; 17(9):2237-42.

Ola, B.; Afnan, M.; Sharif, K.; Papaioannou, S.; Hammadieh, N. and Barratt, C.L. "Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? Considerations of fertilization and embryo development, cost effectiveness and safety", *Hum.Reprod.*, 2001; 16(12):2485-90.

Orief, Y.; Dafopoulos, K. and Al-Hassani, S. "Should ICSI be used in non-male factor infertility?", *Reprod.Biomed.Online*, 2004; 9(3):348-56.

Ozanon, C.; Chouteau, J. and Sutovsky, P. "Clinical adaptation of the sperm ubiquitin tag immunoassay (SUTI): relationship of sperm ubiquitylation with sperm quality in gradient-purified semen samples from 93 men from a general infertility clinic population", *Hum.Reprod.*, 2005; 20(8):2271-8.

Paasch, U.; Grunewald, S.; Fitzl, G. and Glander, H.J. "Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa", *J.Androl.*, 2003; 24(2):246-52.

Palermo, G.; Joris, H.; Devroey, P. and Van Steirteghem, A.C. "Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte", *Lancet*, 1992; 340(8810):17-8.

Palou, E.; Piroto, F.; Sole, J.; Freed, J.H.; Peral, B.; Vilardell, C.; Vilella, R.; Vives, J. and Gaya, A. "Genomic characterization of CD84 reveals the existence of five isoforms differing in their cytoplasmic domains", *Tissue Antigens*, 2000; 55(2):118-27.

Pandian, Z.; Marjoribanks, J.; Ozturk, O.; Serour, G. and Bhattacharya, S. "Number of embryos for transfer following in vitro fertilisation or intra-cytoplasmic sperm injection", *Cochrane Database Syst.Rev.*, 2013; 7 (Art.nºCD003416).

Parmegiani, L.; Cognigni, G.E.; Bernardi, S.; Troilo, E.; Ciampaglia, W. and Filicori, M. ""Physiologic ICSI": hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality", *Fertil.Steril.*, 2010a; 93(2):598-604.

Parmegiani, L.; Cognigni, G.E.; Bernardi, S.; Troilo, E.; Taraborrelli, S.; Arnone, A.; Maccarini, A.M. and Filicori, M. "Comparison of two ready-to-use systems designed for sperm-hyaluronic acid binding selection before intracytoplasmic sperm injection: PICSI vs. Sperm Slow: a prospective, randomized trial", *Fertil.Steril.*, 2012; 98(3):632-7.

Parmegiani, L.; Cognigni, G.E.; Ciampaglia, W.; Pocognoli, P.; Marchi, F. and Filicori, M. "Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection", *J.Assist.Reprod.Genet.*, 2010b; 27(1):13-6.

Parrington, J.; Lai, F.A. and Swann, K. "The soluble mammalian sperm factor protein that triggers Ca²⁺ oscillations in eggs: evidence for expression of mRNA(s) coding for sperm factor protein(s) in spermatogenic cells", *Biol.Cell.*, 2000; 92(3-4):267-75.

Pessot, C.A.; Brito, M.; Figueroa, J.; Concha, I.I.; Yanez, A. and Burzio, L.O. "Presence of RNA in the sperm nucleus", *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 1989; 158(1):272-8.

Phalke, S.P. and Chiplunkar, S.V. "Activation status of gammadelta T cells dictates their effect on osteoclast generation and bone resorption", *Bone Rep.*, 2015; 3:95-103.

Pietrobon, E.O.; Soria, M.; Dominguez, L.A.; Monclus Mde, L. and Fornes, M.W. "Simultaneous activation of PLA2 and PLC are required to promote acrosomal reaction stimulated by progesterone via G-proteins", *Mol.Reprod.Dev.*, 2005; 70(1):58-63.

Platts, A.E.; Dix, D.J.; Chemes, H.E.; Thompson, K.E.; Goodrich, R.; Rockett, J.C.; Rawe, V.Y.; Quintana, S.; Diamond, M.P.; Strader, L.F. and Krawetz, S.A. "Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs", *Hum.Mol.Genet.*, 2007; 16(7):763-73.

Polak de Fried, E. and Denaday, F. "Single and twin ongoing pregnancies in two cases of previous ART failure after ICSI performed with sperm sorted using annexin V microbeads", *Fertil.Steril.*, 2010; 94(1):351.

Powles, R.; Mehta, J.; Kulkarni, S.; Treleaven, J.; Millar, B.; Marsden, J.; Shepherd, V.; Rowland, A.; Sirohi, B.; Tait, D.; Horton, C.; Long, S. and Singhal, S. "Allogeneic blood and bone-marrow stem-cell transplantation in haematological malignant diseases: a randomised trial", *Lancet*, 2000; 355(9211):1231-7.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine "The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline", *Fertil.Steril.*, 2013a; 99(3):673-7.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine "Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion", *Fertil.Steril.*, 2013b; 99(1):63.

Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and Society for Assisted Reproductive Technology "Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for non-male factor infertility: a committee opinion", *Fertil.Steril.*, 2012; 98(6):1395-9.

Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology "Blastocyst culture and transfer in clinical-assisted reproduction: a committee opinion", *Fertil.Steril.*, 2013; 99(3):667-72.

Rawe, V.Y.; Boudri, H.U.; Alvarez Sedo, C.; Carro, M.; Papier, S. and Nodar, F. "Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI", *Reprod.Biomed.Online*, 2010; 20(3):320-3.

Razavi, S.H.; Nasr-Esfahani, M.H.; Deemeh, M.R.; Shayesteh, M. and Tavalae, M. "Evaluation of zeta and HA-binding methods for selection of spermatozoa with normal morphology, protamine content and DNA integrity", *Andrologia*, 2010; 42(1):13-9.

Remohi, J.; Gallardo, E.; Guanes, P.P.; Simon, C. and Pellicer, A. "Donor-recipient synchronization and the use of gonadotrophin-releasing hormone agonists to avoid the premature luteinizing hormone surge in oocyte donation", *Hum.Reprod.*, 1995; 10 Suppl 2:84-90.

Riffo, M.S. and Parraga, M. "Role of phospholipase A2 in mammalian sperm-egg fusion: development of hamster oolemma fusibility by lysophosphatidylcholine", *J.Exp.Zool.*, 1997; 279(1):81-8.

Rivera, R. *Mejora diagnóstica de la infertilidad masculina mediante el uso de técnicas de análisis masivo de proteínas y metabolitos en espermatozoides.*, Universidad de Valencia. Facultad de CC Biológicas. 2017, Valencia (España).

Rivera, R., Sota, N., Dominguez, F., Meseguer, M., Remohí, J. & Garrido, N. 2013, "Differential sperm lipidomic profile between sperm samples achieving pregnancy or not in intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles.", *69th Annual Meeting-ASRM2013*. Boston, Massachusetts, USA., 12-17 October2013.

Romany, L.; Garrido, N.; Motato, Y.; Aparicio, B.; Remohi, J. and Meseguer, M. "Removal of annexin V-positive sperm cells for intracytoplasmic sperm injection in ovum donation cycles does not improve reproductive outcome: a controlled and randomized trial in unselected males", *Fertil.Steril.*, 2014; 102(6):1567-75.

Rosado, A.; Velazquez, A. and Lara-Ricalde, R. "Cell polarography. II. Effect of neuraminidase and follicular fluid upon the surface characteristics of human spermatozoa", *Fertil.Steril.*, 1973; 24(5):349-54.

Rosales, J.C.; Fajardo, H. and García, L. "Capítulo 3. Fecundación y desarrollo del embrión preimplantación". En: G. Pagés and J. Aller, eds. *Infertilidad. Fisiología, diagnóstico y tratamiento*. Primera ed. Caracas: Amolca; 2006. p. 61-88.

Roudebush, W.E. and Purnell, E.T. "Platelet-activating factor content in human spermatozoa and pregnancy outcome", *Fertil.Steril.*, 2000; 74(2):257-60.

Said, T.M.; Agarwal, A.; Zborowski, M.; Grunewald, S.; Glander, H.J. and Paasch, U. "Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique", *J.Androl.*, 2008; 29(2):134-42.

Said, T.; Agarwal, A.; Grunewald, S.; Rasch, M.; Baumann, T.; Kriegel, C.; Li, L.; Glander, H.J.; Thomas, A.J., Jr and Paasch, U. "Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model", *Biol.Reprod.*, 2006; 74(3):530-7.

Sakkas, D.; Mariethoz, E. and St John, J.C. "Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway", *Exp.Cell Res.*, 1999; 251(2):350-5.

Sakkas, D.; Ramalingam, M.; Garrido, N. and Barratt, C.L. "Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes?", *Hum.Reprod.Update*, 2015; 21(6):711-26.

Sakkas, D.; Seli, E.; Manicardi, G.C.; Nijs, M.; Ombelet, W. and Bizzaro, D. "The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: did apoptosis fail?", *Hum.Fertil.(Camb)*, 2004; 7(2):99-103.

Saleh, R.A. and Agarwal, A. "Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice", *J.Androl.*, 2002; 23(6):737-52.

Sanchez, V.; Redmann, K.; Wistuba, J.; Wubbeling, F.; Burger, M.; Oldenhof, H.; Wolkers, W.F.; Kliesch, S.; Schlatt, S. and Mallidis, C. "Oxidative DNA damage in human sperm can be detected by Raman microspectroscopy", *Fertil.Steril.*, 2012; 98(5):1124-9.

Santiso, R.; Tamayo, M.; Gosalvez, J.; Meseguer, M.; Garrido, N. and Fernandez, J.L. "Simultaneous determination in situ of DNA fragmentation and 8-oxoguanine in human sperm", *Fertil.Steril.*, 2010; 93(1):314-8.

Sarsaifi, K.; Haron, A.W.; Vejayan, J.; Yusoff, R.; Hani, H.; Omar, M.A.; Hong, L.W.; Yimer, N.; Ju, T.Y. and Othman, A.M. "Two-dimensional polyacrylamide gel

electrophoresis of Bali bull (*Bos javanicus*) seminal plasma proteins and their relationship with semen quality", *Theriogenology*, 2015; 84(6):956-68.

Sathananthan, A.H. "Paternal centrosomal dynamics in early human development and infertility", *J.Assist.Reprod.Genet.*, 1998; 15(3):129-39.

Sathananthan, A.H.; Kola, I.; Osborne, J.; Trounson, A.; Ng, S.C.; Bongso, A. and Ratnam, S.S. "Centrioles in the beginning of human development", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 1991; 88(11):4806-10.

Sathananthan, A.H.; Ratnam, S.S.; Ng, S.C.; Tarin, J.J.; Gianaroli, L. and Trounson, A. "The sperm centriole: its inheritance, replication and perpetuation in early human embryos", *Hum.Reprod.*, 1996; 11(2):345-56.

Sauer, R.; Coulam, C.B. and Jeyendran, R.S. "Chromatin intact human sperm recovery is higher following glass wool column filtration as compared with density gradient centrifugation", *Andrologia*, 2012; 44 Suppl 1:248-51.

Saunders, C.M.; Larman, M.G.; Parrington, J.; Cox, L.J.; Royse, J.; Blayney, L.M.; Swann, K. and Lai, F.A. "PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development", *Development*, 2002; 129(15):3533-44.

Schatten, H.; Schatten, G.; Mazia, D.; Balczon, R. and Simerly, C. "Behavior of centrosomes during fertilization and cell division in mouse oocytes and in sea urchin eggs", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 1986; 83(1):105-9.

Secciani, F.; Bianchi, L.; Ermini, L.; Cianti, R.; Armini, A.; La Sala, G.B.; Focarelli, R.; Bini, L. and Rosati, F. "Protein profile of capacitated versus ejaculated human sperm", *J.Proteome Res.*, 2009; 8(7):3377-89.

Sette, C.; Bevilacqua, A.; Bianchini, A.; Mangia, F.; Geremia, R. and Rossi, P. "Parthenogenetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa", *Development*, 1997; 124(11):2267-74.

Shen, H.M.; Chia, S.E. and Ong, C.N. "Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility", *J.Androl.*, 1999; 20(6):718-23.

Shi, Q.X.; Chen, W.Y.; Yuan, Y.Y.; Mao, L.Z.; Yu, S.Q.; Chen, A.J.; Ni, Y. and Roldan, E.R. "Progesterone primes zona pellucida-induced activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa", *J.Cell.Physiol.*, 2005; 205(3):344-54.

Shoukir, Y.; Chardonens, D.; Campana, A.; Bischof, P. and Sakkas, D. "The rate of development and time of transfer play different roles in influencing the viability of human blastocysts", *Hum.Reprod.*, 1998; 13(3):676-81.

Simon, L.; Murphy, K.; Aston, K.I.; Emery, B.R.; Hotaling, J.M. and Carrell, D.T. "Optimization of microelectrophoresis to select highly negatively charged sperm", *J.Assist.Reprod.Genet.*, 2016; 33(6):679-88.

Simon, L.; Murphy, K.; Aston, K.I.; Emery, B.R.; Hotaling, J.M. and Carrell, D.T. "Micro-electrophoresis: a noninvasive method of sperm selection based on membrane charge", *Fertil.Steril.*, 2015; 103(2):361-6.

Soares, S.R.; Troncoso, C.; Bosch, E.; Serra, V.; Simon, C.; Remohi, J. and Pellicer, A. "Age and uterine receptiveness: predicting the outcome of oocyte donation cycles", *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, 2005; 90(7):4399-404.

Sociedad Española de Fertilidad, SEF. 2017. *Registro Nacional de Actividad 2015 - Registro SEF. Informe estadístico de Técnicas de Reproducción Asistida 2015*. Available: <https://www.registrosef.com/index.aspx?ReturnUrl=%2f#Anteriores> [2017, 09/18].

Soler, C.; Gaßner, P.; Nieschlag, E.; de Montserrat, J.J.; Gutiérrez, R.; Sancho, M.; Buendía, P.; Álvarez, J.G.; Behre, H.M. and Cooper, T.G. "Utilización del Integrated Semen Analysis System (ISAS)® para el análisis morfológico espermático humano y su significado en las técnicas de reproducción asistida", *Revista Internacional de Andrología*, 2005; 3(3):112-9.

Sone, Y.; Ito, M.; Shirakawa, H.; Shikano, T.; Takeuchi, H.; Kinoshita, K. and Miyazaki, S. "Nuclear translocation of phospholipase C-zeta, an egg-activating factor, during early embryonic development", *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 2005; 330(3):690-4.

Souza Setti, A.; Ferreira, R.C.; Paes de Almeida Ferreira Braga, D; de Cassia Savio Figueira, R; Iaconelli, A., Jr and Borges, E., Jr "Intracytoplasmic sperm injection outcome versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcome: a meta-analysis", *Reprod.Biomed.Online*, 2010; 21(4):450-5.

Specht, I.O.; Hougaard, K.S.; Spano, M.; Bizzaro, D.; Manicardi, G.C.; Lindh, C.H.; Toft, G.; Jonsson, B.A.; Giwercman, A. and Bonde, J.P. "Sperm DNA integrity in

relation to exposure to environmental perfluoroalkyl substances - a study of spouses of pregnant women in three geographical regions", *Reprod.Toxicol.*, 2012; 33(4):577-83.

Sun, Q.Y. and Schatten, H. "Centrosome inheritance after fertilization and nuclear transfer in mammals", *Adv.Exp.Med.Biol.*, 2007; 591:58-71.

Sutovsky, P. "Sperm proteasome and fertilization", *Reproduction*, 2011; 142(1):1-14.

Sutovsky, P. "Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone", *Microsc.Res.Tech.*, 2003; 61(1):88-102.

Sutovsky, P.; Hauser, R. and Sutovsky, M. "Increased levels of sperm ubiquitin correlate with semen quality in men from an andrology laboratory clinic population", *Hum.Reprod.*, 2004; 19(3):628-38.

Sutovsky, P.; Moreno, R.; Ramalho-Santos, J.; Dominko, T.; Thompson, W.E. and Schatten, G. "A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis", *J.Cell.Sci.*, 2001a; 114(Pt 9):1665-75.

Sutovsky, P.; Neuber, E. and Schatten, G. "Ubiquitin-dependent sperm quality control mechanism recognizes spermatozoa with DNA defects as revealed by dual ubiquitin-TUNEL assay", *Mol.Reprod.Dev.*, 2002; 61(3):406-13.

Sutovsky, P.; Terada, Y. and Schatten, G. "Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility", *Hum.Reprod.*, 2001b; 16(2):250-8.

Swann, K.; Larman, M.G.; Saunders, C.M. and Lai, F.A. "The cytosolic sperm factor that triggers Ca^{2+} oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLCzeta", *Reproduction*, 2004; 127(4):431-9.

Tavalaee, M.; Deemeh, M.R.; Arbabian, M. and Nasr-Esfahani, M.H. "Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more useful for clinical sperm selection?", *J.Assist.Reprod.Genet.*, 2012; 29(1):31-8.

Tayebi, B.; Abrishami, F.; Alizadeh, S.; Minayi, N.; Mohammadian, M.; Soleimani, M.; Dehghanifard, A.; Atwan, H.; Ajami, M. and Ajami, M. "Modulation of

microRNAs expression in hematopoietic stem cells treated with sodium butyrate in inducing fetal hemoglobin expression", *Artif.Cells Nanomed Biotechnol.*, 2017; 45(1):146-56.

Thomson, L.K.; Zieschang, J.A. and Clark, A.M. "Oxidative deoxyribonucleic acid damage in sperm has a negative impact on clinical pregnancy rate in intrauterine insemination but not intracytoplasmic sperm injection cycles", *Fertil.Steril.*, 2011; 96(4):843-7.

Toledo, A.A.; Mitchell-Leef, D.; Elsner, C.W.; Slayden, S.M. and Roudebush, W.E. "Fertilization potential of human sperm is correlated with endogenous platelet-activating factor content", *J.Assist.Reprod.Genet.*, 2003; 20(5):192-5.

Tomiya, H.; Takata, H.; Matsuda, T. and Takiguchi, M. "Phenotypic classification of human CD8+ T cells reflecting their function: inverse correlation between quantitative expression of CD27 and cytotoxic effector function", *Eur.J.Immunol.*, 2004; 34(4):999-1010.

Troya, J. and Zorrilla, I. "Annexin V-MACS in infertile couples as method for separation of sperm without DNA fragmentation", *JBRA Assist.Reprod.*, 2015; 19(2):66-9.

Tucker, M.; Graham, J.; Han, T.; Stillman, R. and Levy, M. "Conventional insemination versus intracytoplasmic sperm injection", *Lancet*, 2001; 358(9293):1645-6.

Valli, H.; Sukhwani, M.; Dovey, S.L.; Peters, K.A.; Donohue, J.; Castro, C.A.; Chu, T.; Marshall, G.R. and Orwig, K.E. "Fluorescence- and magnetic-activated cell sorting strategies to isolate and enrich human spermatogonial stem cells", *Fertil.Steril.*, 2014; 102(2):580.e7.

Van den Bergh, M.; Revelard, P.; Bertrand, E.; Biramane, J.; Vanin, A.S. and Englert, Y. "Glass wool column filtration, an advantageous way of preparing semen samples for intracytoplasmic sperm injection: an auto-controlled randomized study", *Hum.Reprod.*, 1997; 12(3):509-13.

van der Steeg, J W; Steures, P.; Eijkemans, M.J.; F Habbema, J.D.; Hompes, P.G.; Kremer, J.A.; van der Leeuw-Harmsen, L.; Bossuyt, P.M.; Repping, S.; Silber, S.J.; Mol, B.W.; van der Veen, F. and Collaborative Effort for Clinical Evaluation in

Reproductive Medicine Study Group "Role of semen analysis in subfertile couples", *Fertil.Steril.*, 2011; 95(3):1013-9.

Varum, S.; Bento, C.; Sousa, A.P.; Gomes-Santos, C.S.; Henriques, P.; Almeida-Santos, T.; Teodosio, C.; Paiva, A. and Ramalho-Santos, J. "Characterization of human sperm populations using conventional parameters, surface ubiquitination, and apoptotic markers", *Fertil.Steril.*, 2007; 87(3):572-83.

Velker, B.A.; Denomme, M.M. and Mann, M.R. "Embryo culture and epigenetics", *Methods Mol.Biol.*, 2012; 912:399-421.

Vermeij, B.G.; Chapman, M.G.; Cooke, S. and Kilani, S. "The relationship between sperm head retardance using polarized light microscopy and clinical outcomes", *Reprod.Biomed.Online*, 2015; 30(1):67-73.

Virant-Klun, I.; Skutella, T.; Hren, M.; Gruden, K.; Cvjeticanin, B.; Vogler, A. and Sinkovec, J. "Isolation of small SSEA-4-positive putative stem cells from the ovarian surface epithelium of adult human ovaries by two different methods", *Biomed.Res.Int.*, 2013; 2013:690415.

Wang, H.; Zhou, Z.; Xu, M.; Li, J.; Xiao, J.; Xu, Z.Y. and Sha, J. "A spermatogenesis-related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical applications", *J.Mol.Med.(Berl)*, 2004; 82(5):317-24.

Weissman, I.L. "Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities", *Science*, 2000; 287(5457):1442-6.

Welsch, U. and Deller, T. "Capítulo 13. Sistema Genital". En: U. Welsch, ed. *Sobotta.Histología*. Tercera ed. México, D.F.: Editorial Médica Panamericana; 2014. p. 403-441.

Whitfield, M.; Pollet-Villard, X.; Levy, R.; Drevet, J.R. and Saez, F. "Posttesticular sperm maturation, infertility, and hypercholesterolemia", *Asian J.Androl.*, 2015; 17(5):742-8.

Winters, B.R. and Walsh, T.J. "The epidemiology of male infertility", *Urol.Clin.North Am.*, 2014; 41(1):195-204.

World Health Organization. *WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen*. Fifth ed, Geneva: WHO Press; 2010.

Worrilow, K.C.; Eid, S.; Woodhouse, D.; Perloe, M.; Smith, S.; Witmyer, J.; Ivani, K.; Khoury, C.; Ball, G.D.; Elliot, T. and Lieberman, J. "Use of hyaluronan in the selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection (ICSI): significant improvement in clinical outcomes--multicenter, double-blinded and randomized controlled trial", *Hum.Reprod.*, 2013; 28(2):306-14.

Wu, A.T.; Sutovsky, P.; Manandhar, G.; Xu, W.; Katayama, M.; Day, B.N.; Park, K.W.; Yi, Y.J.; Xi, Y.W.; Prather, R.S. and Oko, R. "PAWP, a sperm-specific WW domain-binding protein, promotes meiotic resumption and pronuclear development during fertilization", *J.Biol.Chem.*, 2007; 282(16):12164-75.

Wu, T.F. and Chu, D.S. "Sperm chromatin: fertile grounds for proteomic discovery of clinical tools", *Mol.Cell.Proteomics*, 2008; 7(10):1876-86.

Xu, W.; Hu, H.; Wang, Z.; Chen, X.; Yang, F.; Zhu, Z.; Fang, P.; Dai, J.; Wang, L.; Shi, H.; Li, Z. and Qiao, Z. "Proteomic characteristics of spermatozoa in normozoospermic patients with infertility", *J.Proteomics*, 2012; 75(17):5426-36.

Yan, Q.; Malashkevich, V.N.; Fedorov, A.; Fedorov, E.; Cao, E.; Lary, J.W.; Cole, J.L.; Nathenson, S.G. and Almo, S.C. "Structure of CD84 provides insight into SLAM family function", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 2007; 104(25):10583-8.

Yeste, M.; Jones, C.; Amdani, S.N.; Patel, S. and Coward, K. "Oocyte activation deficiency: a role for an oocyte contribution?", *Hum.Reprod.Update*, 2016; 22(1):23-47.

Yoon, S.Y.; Eum, J.H.; Lee, J.E.; Lee, H.C.; Kim, Y.S.; Han, J.E.; Won, H.J.; Park, S.H.; Shim, S.H.; Lee, W.S.; Fissore, R.A.; Lee, D.R. and Yoon, T.K. "Recombinant human phospholipase C zeta 1 induces intracellular calcium oscillations and oocyte activation in mouse and human oocytes", *Hum.Reprod.*, 2012; 27(6):1768-80.

Yoshida, M.; Kawano, N. and Yoshida, K. "Control of sperm motility and fertility: diverse factors and common mechanisms", *Cell Mol.Life Sci.*, 2008; 65(21):3446-57.

Young, C.; Grasa, P.; Coward, K.; Davis, L.C. and Parrington, J. "Phospholipase C zeta undergoes dynamic changes in its pattern of localization in sperm during capacitation and the acrosome reaction", *Fertil.Steril.*, 2009; 91(5 Suppl):2230-42.

Zahedi, A.; Tavalaei, M.; Deemeh, M.R.; Azadi, L.; Fazilati, M. and Nasr-Esfahani, M.H. "Zeta potential vs apoptotic marker: which is more suitable for ICSI sperm selection?", *J.Assist.Reprod.Genet.*, 2013; 30(9):1181-6.

Zaiss, M.; Hirtreiter, C.; Rehli, M.; Rehm, A.; Kunz-Schughart, L.A.; Andreesen, R. and Hennemann, B. "CD84 expression on human hematopoietic progenitor cells", *Exp.Hematol.*, 2003; 31(9):798-805.

Zakhari, A.; Ates, S.; Shaulov, T. and Dahan, M.H. "Does ovarian reserve affect outcomes in single ideal blastocyst transfers in women less than 40 years of age?", *Arch.Gynecol.Obstet.*, 2018; 297(1):233-9.

Zarei-Kheirabadi, M.; Shayegan Nia, E.; Tavalaei, M.; Deemeh, M.R.; Arabi, M.; Forouzanfar, M.; Javadi, G.R. and Nasr-Esfahani, M.H. "Evaluation of ubiquitin and annexin V in sperm population selected based on density gradient centrifugation and zeta potential (DGC-Zeta)", *J.Assist.Reprod.Genet.*, 2012; 29(4):365-71.

Zhu, Y.; Wu, Y.; Jin, K.; Lu, H.; Liu, F.; Guo, Y.; Yan, F.; Shi, W.; Liu, Y.; Cao, X.; Hu, H.; Zhu, H.; Guo, X.; Sha, J.; Li, Z. and Zhou, Z. "Differential proteomic profiling in human spermatozoa that did or did not result in pregnancy via IVF and AID", *Proteomics Clin.Appl.*, 2013; 7(11-12):850-8.

Zimmerman, S. and Sutovsky, P. "The sperm proteasome during sperm capacitation and fertilization", *J.Reprod.Immunol.*, 2009; 83(1-2):19-25.

Zohni, K.; Zhang, X.; Tan, S.L.; Chan, P. and Nagano, M. "CD9 is expressed on human male germ cells that have a long-term repopulation potential after transplantation into mouse testes", *Biol.Reprod.*, 2012; 87(2):27.